

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Caracterización poblacional de *Plasmodium falciparum* en Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de

Licenciada en Ciencias Biológicas

**CLAUDIA ABIGAIL VERA ARIAS**

Quito, 2015

Yo, Dr. Fabián Sáenz, certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Claudia Abigail Vera Arias ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por lo tanto puede presentar para la calificación correspondiente.

Quito, 26 de noviembre de 2015

Dr. Fabián Sáenz

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

A mis padres les dedico este triunfo,  
por ser las personas que siempre creyeron en mí,  
me cuidaron y me hicieron ser la persona que soy.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, especialmente a la Escuela de Ciencias Biológicas.

Al Doctor Fabián Sáenz, Director de la disertación por todo lo que me ha enseñado, la paciencia y la motivación que me dio para realizar este trabajo.

Al Doctor Mario Grijalva, Director del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Crónicas y a todo su equipo que lo conforman, especialmente al Mtr. Cesar Yumiseva y Lcda. Andrea López por la ayuda en la elaboración de algunos mapas.

Al Ministerio de Salud Pública, Dr Enrique Castro, por la colaboración brindada en el estudio.

A los microscopistas de SNEM, por la toma de muestras.

A los pacientes, por participar en el estudio.

A mis padres, Juanita Arias M. y Luis Alberto Vera C., por ser mi pilar, mi guía y la fuerza que necesitaba para cumplir mis sueños. Por siempre confiar en mí y permitirme crecer como persona.

A mi hermana, Nicole, por estar siempre a mi lado, darme toda su comprensión en momentos difíciles y no permitir que me rinda por ningún motivo.

A mis amigas, Gaby Valenzuela, Eli Veloz Haro y Ani Rivadeneira que me han brindado su amistad, apoyo y todos los buenos momentos que hemos pasado juntas.

Al resto de mi equipo de trabajo “Grupo Malaria”, Andre Poveda, Juan Ca Torres, Eileen Vélez, Andrés Núñez y Thalía Arroba por brindarme su ayuda, momentos gratos y estar siempre dispuestos a colaborar para culminar esta investigación.

A mis amigos, Eli Veloz Villavicencio, André Lazzati, Emilio Ayarza, Chavelita Tamayo, Emi Ramos, Cami Cilveti, Angelita López, y todos aquellos amigos y colegas que de una u otra forma han colaborado con el desarrollo de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
3.1 <i>PLASMODIUM</i> : EL PARÁSITO CAUSANTE DE LA MALARIA .....	7
3.1.1 CICLO DE VIDA.....	7
3.1.2 EL GENOMA DE <i>PLASMODIUM</i> .....	9
3.2 VECTOR .....	11
3.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN .....	12
3.3.1 PfHRP2 y PfHRP3 .....	14
3.4 HISTORIA DE LA MALARIA .....	16
3.5 MALARIA EN LATINOAMÉRICA .....	18
3.6 MALARIA EN ECUADOR .....	21
3.7 DROGAS ANTIMALÁRICAS Y RESISTENCIA .....	23
3.8 LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA .....	26
3.9 ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS PARÁSITOS DE LA MALARIA .....	28

3.9.1	GENÉTICA DE POBLACIONES .....	28
3.9.2	MARCADORES MOLECULARES .....	29
3.9.3	ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES DE <i>P. falciparum</i> EN EL MUNDO.....	32
3.9.4	ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES DE <i>P. falciparum</i> EN AMÉRICA DEL SUR.....	33
3.9.5	ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES EN ECUADOR.....	36
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	ÉTICA.....	38
4.2	OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE <i>Plasmodium falciparum</i> .....	38
4.3	CEPAS ESTÁNDAR DE <i>P. falciparum</i> .....	38
4.4	EXTRACCIÓN DE ADN.....	39
4.4.1	EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE PAPEL FILTRO UTILIZANDO Chelex-100 .....	39
4.4.2	EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE PAPEL FILTRO POR KIT .....	39
4.4.3	EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE COMPLETA .....	40
4.5	IDENTIFICACIÓN DE <i>P. falciparum</i> .....	41

4.5.1	DETERMINACIÓN DE LA ESPECIE <i>P. falciparum</i> POR MICROSCOPÍA .	41
4.5.2	DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE <i>P. falciparum</i> POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	41
4.6	CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69 .....	43
4.6.1	AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly-A, PfPK2, TA109 Y 2490 POR PCR SEMI-ANIDADA .....	44
4.6.2	AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES C2M34 Y C3M69.....	45
4.7	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE FRAGMENTOS DE LOS MICROSATÉLITES .....	45
4.8	ANÁLISIS DE TAMAÑO DE FRAGMENTO DE MICROSATÉLITES .....	46
4.8.1	ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN CON AYUDA DEL SOFTWARE Peak Scanner.....	46
4.9	ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL .....	46
4.9.1	SOFTWARE Arlequin .....	46
4.9.2	SOFTWARE Network.....	47
4.9.3	SOFTWARE Structure .....	47



4.9.4	SOFTWARE LIAN 3.5 .....	48
4.9.5	SOFTWARE DARwin 6.0.5 .....	48
4.10	GENOTIPOS DE <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> .....	48
4.10.1	PCR DEL GEN <i>Pfhrp2</i> DE <i>P. falciparum</i> .....	49
4.10.2	PCR DEL GEN <i>Pfhrp3</i> DE <i>P. falciparum</i> .....	50
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1	MUESTRAS USADAS EN EL ESTUDIO .....	52
5.2	CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE <i>P. falciparum</i> .....	52
5.3	GENOTIPOS DE <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> .....	53
5.4	CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69 .....	54
5.5	ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES DE <i>P. falciparum</i> DE ECUADOR.....	55
5.5.1	POLIMORFISMO Y HETEROCIGOSIDAD .....	56
5.5.2	DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD) .....	56
5.5.3	ÍNDICES DE FIJACIÓN Y ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) .....	57

5.5.4	RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES .....	57
5.5.5	ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	59
5.6	COMPARACIÓN ENTRE <i>P. falciparum</i> ECUATORIANOS Y <i>P. falciparum</i> DE PAÍSES VECINOS.....	59
5.6.1	COMPARACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES ECUATORIANAS Y LAS POBLACIONES PERUANAS .....	60
5.6.2	COMPARACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES ECUATORIANAS Y LA LOCALIDAD DE NARIÑO (COLOMBIA).....	64
5.6.3	COMPARACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES ECUATORIANAS, LINAJES CLONALES DE PERÚ (A, B, C, D Y E) Y POBLACIONES DE NARIÑO (COLOMBIA).....	66
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
6.1	MUESTRAS USADAS EN EL ESTUDIO.....	69
6.2	CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE <i>Plasmodium falciparum</i> .....	69
6.3	GENOTIPOS DE <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> .....	70
6.4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DE <i>Plasmodium falciparum</i> ECUATORIANAS.....	73
6.4.1	POLIMORFISMO Y HETEROCIGOSIDAD .....	74

6.4.2	DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD) .....	76
6.4.3	ÍNDICE DE FIJACIÓN Y AMOVA .....	77
6.4.4	RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES .....	78
6.4.5	ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	80
6.5	COMPARACIÓN ENTRE <i>P. falciparum</i> ECUATORIANOS Y <i>P. falciparum</i> DE PAÍSES VECINOS.....	81
6.6	HALLAZGOS IMPORTANTES .....	86
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>FIGURAS .....</b>	<b>112</b>
<b>10.</b>	<b>TABLAS .....</b>	<b>144</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>161</b>

## 9. LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de malaria en el mundo. ....	112
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida del parásito <i>Plasmodium falciparum</i> y desarrollo de gametocitos.....	113
<b>Figura 3.</b> Migración del parásito <i>Plasmodium falciparum</i> entre los siglos XVI y XIX.....	115
<b>Figura 4.</b> Mapa de distribución de las muestras de <i>P. falciparum</i> utilizadas en el estudio...	116
<b>Figura 5.</b> PCR anidada para determinar la especie <i>P. falciparum</i> . ....	118
<b>Figura 6.</b> PCR-PET para reconfirmar la especie <i>P. falciparum</i> . ....	119
<b>Figura 7.</b> PCR anidada para determinar la presencia de los genes <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> en las muestras Pf41-Pf64. ....	121
<b>Figura 8.</b> Mapa de la distribución de/los genes <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> . ....	122
<b>Figura 9.</b> Amplificación de marcadores microsatélites utilizados en este estudio en muestras Pf060-Pf062. ....	126
<b>Figura 10.</b> Tamaño de microsatélites usados en este estudio por análisis de fragmentos. ...	128
<b>Figura 11.</b> Red de relaciones genéticas entre <i>P. falciparum</i> ecuatorianos. ....	130
<b>Figura 12.</b> Árbol del vecino más cercano entre muestras de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Orellana y Sucumbíos. ....	131

<b>Figura 13.</b> Inferencia de la estructura genética de <i>P. falciparum</i> en Ecuador analizada con el programa Structure ver. 2.3.4. ....	132
<b>Figura 14.</b> Mapa distribución de las muestras de <i>P. falciparum</i> en Ecuador y Perú. ....	133
<b>Figura 15.</b> Red de relaciones genéticas entre <i>P. falciparum</i> ecuatorianos y peruanos. ....	134
<b>Figura 16.</b> Inferencia de la estructura genética de <i>P. falciparum</i> de Ecuador y los linajes clonales (A, B, C, D y E) de Perú analizada con el programa Structure ver. 2.3.4. ordenado por Q. ....	135
<b>Figura 17.</b> Red de relaciones genéticas entre <i>P. falciparum</i> ecuatorianos y colombianos. ...	136
<b>Figura 18.</b> Inferencia de la estructura genética de <i>P. falciparum</i> de Ecuador y Nariño (Colombia) analizada con el programa Structure ver. 2.3.4. ....	138
<b>Figura 19.</b> Red de relaciones genéticas entre <i>P. falciparum</i> ecuatorianos, peruanos y colombianos. ....	139
<b>Figura 20.</b> Estructura de la población de muestras de <i>P. falciparum</i> de Ecuador en comparación con Colombia y Perú (N = 238). ....	141

## 10. LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de primers utilizados en la determinación molecular de la especie <i>Plasmodium falciparum</i> .....	144
<b>Tabla 2.</b> Lista de primers utilizados en la determinación molecular de los microsatélites neutrales de la especie <i>Plasmodium falciparum</i> .....	145
<b>Tabla 3.</b> Ubicación, tamaño del producto, motivo de repetición y rango de tamaño de los microsatélites neutrales.....	146
<b>Tabla 4.</b> Lista de primers utilizados en la determinación molecular de los genes <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> en la especie <i>Plasmodium falciparum</i> .....	146
<b>Tabla 5.</b> Muestras de <i>P. falciparum</i> utilizadas en este estudio.....	147
<b>Tabla 6.</b> Muestras de <i>P. falciparum</i> analizadas por PCR-PET.....	149
<b>Tabla 7.</b> Presencia de <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> en las muestras colectadas.....	151
<b>Tabla 8.</b> Prevalencia de <i>Pfhrp2</i> y prevalencia de <i>Pfhrp3</i> por cada localidad.....	153
<b>Tabla 9.</b> Prevalencia de <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> por cada localidad.....	153
<b>Tabla 10.</b> Número de alelos en la población obtenido con el programa Arlequin en Esmeraldas.....	154
<b>Tabla 11.</b> Número de alelos en la población obtenido con el programa Arlequin en San Lorenzo.....	154

<b>Tabla 12.</b> Heterocigosidad esperada en las poblaciones ecuatorianas, linajes peruanos y Nariño (Colombia).....	155
<b>Tabla 13.</b> Heterocigosidad esperada y desequilibrio de ligamiento en <i>P. falciparum</i> Ecuatorianos, obtenido con el programa Lian. ....	156
<b>Tabla 14.</b> Comparación de Fsts en muestra de <i>P. falciparum</i> de Ecuador, Perú y Colombia. Linajes clonales de Perú (A, B, C, D, E). ....	156
<b>Tabla 15.</b> AMOVA de las muestras Ecuatorinas, Peruanas y Colombianas. ....	157
<b>Tabla 16.</b> Heterocigosidad esperada en las ecuatorianas, poblaciones peruanas y Nariño (Colombia).....	158
<b>Tabla 17.</b> Comparación de Fsts en muestra de <i>P. falciparum</i> de Ecuador, Perú y Colombia. ....	158
<b>Tabla 18.</b> Número de alelos por cada localidad obtenido con el programa Arlequin. ....	159
<b>Tabla 19.</b> Número de loci polimórficos por cada localidad. Localidades ecuatorianas, peruanas y Nariño (Colombia). ....	159
<b>Tabla 20.</b> Número de alelos por cada localidad obtenido con el programa Arlequin. ....	160
<b>Tabla 21.</b> Número de loci polimórficos por cada localidad. Localidades ecuatorianas, clones peruanas y Nariño (Colombia). ....	160

## 11. LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Consentimiento informado que se usó para la toma de muestras de las personas que participaron en el estudio.....	161
<b>Anexo 2.</b> Material necesario para realizar electroforesis .....	164
<b>Anexo 3.</b> Contenido del TBE 10X en 1 Litro.....	165



## 1. RESUMEN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por el mosquito hembra del género *Anopheles*, está distribuida en las zonas tropicales alrededor del mundo. *Plasmodium falciparum* tiene mayor prevalencia en el continente africano y es la especie que causa mayor tasa de mortalidad y morbilidad. En Ecuador, la malaria está presente en la Costa y la Amazonia. En el año 2014 se reportaron 243 casos causados por *P. falciparum* y *P. vivax*.

Los métodos para diagnosticar malaria son: microscopía, pruebas rápidas (RDT) que reconocen el antígeno HRP2 y métodos moleculares como PCR. Estudios previos han demostrado que existen delecciones y variaciones en las secuencias de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* que producen errores en el diagnóstico de la malaria por RDTs.

En América del Sur, las poblaciones de *P. falciparum* evidencian alta clonalidad que se debe a la baja tasa de transmisión, endogamia y expansiones epidémicas, además las poblaciones presentan alto desequilibrio de ligamiento (LD).

En este estudio se realizó la caracterización molecular de las poblaciones de *P. falciparum* de Ecuador utilizando siete marcadores moleculares microsatélites neutrales y análisis de tamaño de fragmentos. Las poblaciones de *P. falciparum* ecuatorianos fueron además comparadas con las poblaciones de países vecinos (Perú y Colombia). Se determinó también la presencia de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* mediante PCR anidada.

Los resultados de este estudio demuestran que las poblaciones de *P. falciparum* en Ecuador presentan alta clonalidad y LD, como se ha demostrado en países vecinos. Específicamente,

los *P. falciparum* del cantón Esmeraldas son altamente clonales e idénticos a los que circulaban en Perú a finales del siglo XX mientras que los *P. falciparum* de San Lorenzo son más diversos y están relacionados con parásitos del sur de Colombia y de la Amazonia peruana. Además el 11,87% de las muestras no presentaron el gen *Pfhrp2*, y 21% de las muestras no presentaron el gen *Pfhrp3*. Los resultados de este estudio aportan al conocimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *P. falciparum*, así como los posibles orígenes de los casos de *P. falciparum* en Ecuador. Estos resultados pueden aportar a políticas para la eliminación de *P. falciparum* en el país.

**Palabras Clave:** clonalidad, diversidad genética, malaria, microsatélites, *Pfhrp2*, *Pfhrp3*, *Plasmodium falciparum*.

## 2. ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the protozoan *Plasmodium* and transmitted by female *Anopheles* mosquitoes. It is distributed in tropical areas around the world. *Plasmodium falciparum* has the highest prevalence in Africa and it is a major cause of morbidity and mortality. In Ecuador, malaria occurs in the Amazon and Coastal regions. In 2014, 243 cases of *P. falciparum* and *P. vivax* were reported in the country.

Malaria diagnosis methods include: microscopic diagnosis, rapid diagnostic tests (RDTs) that detect malaria antigens like PfHRP2, and molecular diagnostic methods. Previous studies reported parasites carrying deletions for HRP2 and HRP3 and variation in the sequence of *Pfhrp2* and *Pfhrp3*, all of which cause errors in RDTs.

The South American population of *P. falciparum* presents high clonality due to low transmission, endogamy and epidemic expansion, and the population presents high levels of linkage disequilibrium (LD).

In this investigation, we characterized the populations of *P. falciparum* in Ecuador using seven neutral microsatellites and fragment size analysis. The results were analyzed by genetic population software. In addition, Ecuadorian, Peruvian and Colombian *P. falciparum* populations were compared. Moreover, we determined the presence of *Pfhrp2* and *Pfhrp3* using nested PCR.

This study shows that Ecuadorian *P. falciparum* has high clonality and LD, similar to neighboring countries. *P. falciparum* parasites of Esmeraldas county that were tested carried a genotypic profile nearly identical to that of Peruvian *P. falciparum* which circulated in Peru

during the end of the 20<sup>th</sup> century. On the other hand, *P. falciparum* of San Lorenzo county were more diverse and were related to south Colombian parasites and Peruvian Amazon parasites. Furthermore, 11,87% of the studied *P. falciparum* lacked HRP2 and 21% lacked HRP3. The results of this study will also increase knowledge about population genetic structure and diversity of *P. falciparum* population, as well as determining the origin of *P. falciparum* infections in Ecuador. This study will inform *P. falciparum* elimination policies in the country.

**Keywords:** clonality, genetic diversity, malaria, microsatellites, *Pfhrp2*, *Pfhrp3*, *Plasmodium falciparum*.

### 3. INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por el mosquito hembra del género *Anopheles*. Existen cuatro especies principales, que se transmiten entre seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) (Rojo-Marcos, *et al.* 2011); además de *P. knowlesi* que puede causar enfermedad en el ser humano (Singh & Danashvar, 2013; WHO, 2014). Esta enfermedad es una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en zonas tropicales y sub-tropicales del mundo (Bousema & Drakeley, 2011; Yalcindag, *et al.* 2012).

*P. falciparum* tiene mayor prevalencia en el continente africano, y es la especie responsable de la mayor tasa de mortalidad y morbilidad (WHO, 2014; revisado por Laishram, *et al.* 2012), es decir, de las cinco especies ésta es la más maligna (Yalcindag, *et al.* 2012). *P. vivax* tiene una distribución mayor que la de *P. falciparum* porque puede estar en mosquitos que se encuentran en temperaturas menores, además los mosquitos pueden sobrevivir a mayores altitudes y climas más fríos (WHO, 2014).

La malaria se encuentra en 97 países (Fig. 1) pero desde el 2000 se ha reportado una reducción en la tasa de incidencia de entre el 30% y 47%, respecto de la tasa de mortalidad en el continente Africano, donde se estima que ocurren el 90% de las muertes por malaria. La mayoría de muertes son de niños menores a los 5 años de edad y mujeres embarazadas (WHO, 2014; Crompton, *et al.* 2014).

En la actualidad, el paludismo representa todavía un problema de salud muy serio (Talundzic, *et al.*, 2014; WHO, 2014), porque alrededor de la mitad de la población mundial corre riesgo

de ser infectada con *Plasmodium* (Talundzic, *et al.*, 2014). Dos cientos ochenta millones de personas presentan episodios clínicos y cerca de 655 mil de los casos desembocan en la muerte del paciente (Crompton, *et al.* 2014; Talundzic, *et al.*, 2014).

Los síntomas principales de la enfermedad en su etapa inicial son la fiebre, cefaleas, escalofríos y vómitos. Éstos aparecen entre 10 a 15 días después de que el mosquito hembra, del género *Anopheles*, pica al ser humano. Si no se tratan los síntomas en las primeras horas, la malaria causada por *P. falciparum* puede agravarse llevando, incluso, a la muerte del paciente. En casos más avanzados, los síntomas que se presentan pueden ser anemia grave, distrés respiratorio, relacionado con la acidosis metabólica, infecciones multiorgánicas o, en casos severos, malaria cerebral (WHO, 2013).

Existen algunas poblaciones en las cuales la tasa de transmisión de la enfermedad es muy alta, a estas se las conoce como hotspots; existen dos definiciones principales: a) la Organización Mundial de la Salud (WHO) define hotspots como un foco definido de transmisión de la malaria en una localidad donde se encuentra la enfermedad actualmente o donde había la enfermedad (Carter, *et al.* 2000). El tamaño del foco de transmisión depende del sitio de reproducción del vector y de la dispersión que tenga el vector, que es de varios kilómetros (Bousema, *et al.* 2012); o b) es una parte geográfica donde la intensidad de transmisión supera el nivel promedio, en ellas una pequeña parte de la población, 20%, es la responsable del 80% de la transmisión de malaria (Bousema, *et al.* 2012).

Existen estrategias que permiten controlar a la enfermedad, entre los que destacan: a) el control vectorial mediante el uso de insecticidas de acción residual, b) fumigaciones tanto en

el interior como en el exterior de las casas, c) prevención y cura usando tratamientos químicos; y, d) uso de mosquiteros tratados con insecticidas (WHO, 2014).

Al paludismo se lo puede catalogar por rangos. Según su severidad existen tres que son: 1) severo y complicado, 2) medio y no complicado y, 3) asintomático. En el primer caso se pueden hallar numerosos estudios epidemiológicos, porque es la causa principal de muerte por malaria, puede desencadenar en coma por malaria cerebral, hipoglucemia, convulsiones, colapso circulatorio e incluso la muerte del enfermo. Estos casos se pueden encontrar, principalmente, en lugares donde existe alta transmisión y se observa una correlación negativa entre la severidad de los síntomas y la edad, es decir, a mayor edad, menor severidad de los síntomas (WHO, 2013). En el segundo caso (medio y no complicado), los pacientes presentan fiebre, anemia, vómitos, diarrea acuosa, etc. Los síntomas no son tan fuertes como en casos severos, se cree que esto es producto de desarrollo de inmunidad (Grobusch, *et al.* 2005); y, por último, los casos asintomáticos, como su nombre lo indica, carecen de síntomas (Alves, *et al.*, 2002), pero pueden ser un reservorio importante para mantener la transmisión (revisado por Laishram, *et al.* 2012).

### **3.1 *PLASMODIUM*: EL PARÁSITO CAUSANTE DE LA MALARIA**

#### **3.1.1 CICLO DE VIDA**

Los parásitos que causan la malaria pertenecen al reino Protista, filum Apicomplexa, orden Aemosporida, género *Plasmodium* (Gardner, *et al.*, 2002).

El ciclo de vida de las especies de *Plasmodium* es complejo (Fig. 2) (Enomoto, *et al.*, 2012). La infección humana comienza por la inoculación de esporozoitos por medio de la saliva de

una infectada hembra del género *Anopheles*, mientras se alimenta. La mayoría de esporozoitos viajan al hígado, de forma rápida, por medio del torrente sanguíneo, para evitar ser eliminados por el bazo. En el hígado invaden los hepatocitos y se multiplican (de forma asexual) lo que conlleva la diferenciación y posterior liberación de merozoitos en el torrente sanguíneo donde infectan a eritrocitos; dentro de ellos el parásito pasa por diferentes estadios (trofozoitos y esquizontes) por reproducción asexual; nuevos merozoitos se desarrollan y como resultado se produce lisis en los eritrocitos liberando de 8 a 32 parásitos que invaden nuevas células sanguíneas (Bousema & Drakeley, 2011; Enomoto, *et al.*, 2012). Las formas maduras de los parásitos intraeritrocíticos: trofozoitos y esquizontes, remodelan el citoesqueleto y la membrana plasmática para crear protuberancias citoadhesivas así como para remodelar las vías de entrada de nutrientes y alterar la estabilidad mecánica de los eritrocitos, lo que genera una adhesión del parásito a los vasos sanguíneos, provocando que se bloquee la microcirculación lo que da como resultado la disfunción de múltiples órganos, típicamente causando malaria cerebral (Enomoto, *et al.*, 2012). Algunos merozoitos desarrollan gametocitos (estadios sexuales) que son transportados al estómago del mosquito cuando ingieren sangre de una persona infectada (Bousema & Drakeley, 2011; Garcia, *et al.*, 2006).

La maduración de los estadios sexuales tiene morfológicamente cinco estadios distinguibles y solo el estadio V circula por la sangre periférica. En el estómago del vector cada gametocito puede formar un macrogameto y entre uno a ocho microgametos (Bousema & Drakeley, 2011; Garcia, *et al.*, 2006).

En el intestino del mosquito se produce la fusión de los gametos que da como resultado la formación del cigoto que se desarrolla en un ooquinete móvil que puede penetrar la pared del intestino para formar un ooquiste donde se forman los esporozoitos. Éste se agranda con el



tiempo hasta que explota liberando esporozoitos a la hemolinfa que viajan a las glándulas salivales del mosquito, para ser transmitido a otro hospedero (Bousema & Drakeley, 2011; Garcia, *et al.*, 2006) (Fig. 2).

### 3.1.2 EL GENOMA DE *PLASMODIUM*

*Plasmodium* es haploide en casi todo su ciclo y posee 14 cromosomas con un genoma nuclear de 22.8 mega-bases (Mb). Existe variación en el tamaño en los cromosomas, desde 0,643 Mb hasta 3,29 Mb. Tienen una composición general de 80,6% de A+T, alrededor del 90% se encuentra en los intrones y zonas intergénicas. Se han identificado 5 300 genes que codifican para proteínas, siendo la densidad de genes en *P. falciparum* de 1 gen por cada 4 338 pares de bases (pb) y, existen aproximadamente 54% de intrones en sus genes. Excluyendo a los intrones, el largo de los genes de *P. falciparum* es de 2,3 kilo-bases (Kb), notablemente mayor al promedio de largo de los genes en otros organismos que va de 1,3 Kb a 1,6 Kb. No se han identificado elementos transposición o retrotransposones (Gardner, *et al.*, 2002). La expresión del 52% de los genes se ha detectado en varios estadios del ciclo de vida del parásito, además se han descubierto proteínas que tienen parecido a las de otros organismos (Gardner, *et al.*, 2002).

Oehring, *et al.* (2012) detectaron que el 37,3% de las proteínas están implicadas en los procesos de transcripción, remodelamiento de cromatina, replicación y reparación de ADN, unión y procesamiento de ARN; 14,7% de proteínas están relacionadas con interacciones de la cromatina, control del ciclo celular, mitosis, procesamiento y unión del ARN, plegamiento y modificación de proteínas, degradación de proteínas, entre otras funciones; 11,8% de las proteínas representan subunidades ribosomales o factores de traducción asociados; y 4,4% de

las proteínas están localizadas en las mitocondrias, aparato Golgi y vacuolas. Treinta y un coma ocho por ciento de las proteínas nucleares tienen funciones desconocidas (Oehring, *et al.*, 2012).

El genoma mitocondrial es pequeño, tiene alrededor de 6 Kb, y no codifica ARNts por lo que la mitocondria importa los ARNts necesarios. Mediante esta importación los ARNts citoplasmáticos pueden realizar la síntesis proteica mitocondrial. El genoma del apicoplasto genera sus propios ARNts para realizar la síntesis proteica dentro de la organela (Gardner, *et al.* 2002).

*P. falciparum* no contiene secuencias largas de repetición en tándem de genes de ARN ribosomal (ARNr), contiene varias unidades de 18S-5.8S-28S de ARNr distribuidas por diferentes cromosomas. Las secuencias que codifican para un gen de ARNr son diferentes a las secuencias que codifican otro ARNr de otra unidad. Por la capacidad de cambio de propiedades de los ribosomas, el parásito es capaz de alterar la tasa de traducción, ya sea a nivel global o de ARN mensajeros específicos (mRNAs), cambiando la tasa de crecimiento de las células o alterando los patrones de desarrollo de las células (Gardner, *et al.*, 2002).

Los gametocitos de *P. falciparum* son muy diferentes a los estadios asexuales, los análisis de transcriptoma identificaron de 250 a 300 genes que están involucrados en el aumento de mRNA durante el desarrollo de gametocitos, de los cuales la gran mayoría se expresan exclusivamente en los gametocitos femeninos o masculinos (Bousema & Drakeley, 2011).

### 3.2 VECTOR

El vector que transmite la malaria es la hembra de una especie de mosquito que pertenece al orden Diptera, familia Culicidae, género *Anopheles* (Buchsbaum, 2013). El género contiene 400 especies diferentes de mosquitos pero solo 30 de ellas son consideradas vectores importantes de la enfermedad, como por ejemplo *An. arabiensis*, *An. melas*, *An. albimanus*, *An. nuneztovari*, *An. punctimacula*, *An. melus*, *An. nili*, etc. (Sinka, *et al.*, 2010; WHO, 2014). Sin embargo, la especie más importante y principal vector en África es *An. gambiae* porque es sumamente eficiente, es altamente adaptable y se alimenta principalmente de humanos, además de tener un ciclo de vida largo (Crompton, *et al.*, 2014). *An. gambiae* junto con *An. arabiensis* y *An. bwambae* entre otras especies, pertenecen al complejo de especies que presentan mayor efectividad y eficiencia en su papel de vector de la enfermedad (Sinka, *et al.*, 2010).

En Latinoamérica, se puede encontrar alrededor de 90 especies de *Anopheles* descritas, entre las cuales destacan *An. darlingi*, *An. nuneztovari*, *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus* y *An. aquasalis*, que son consideradas como vectores de escala regional importantes. Otros vectores, considerados secundarios, son *An. albirarsis*, *An. punctimacula*, *An. trinkae*, entre otros. Sin embargo, se considera que algunos otros anofelinos distribuidos ampliamente en la región también son vectores de la enfermedad aunque no se conoce su papel en la transmisión (Arevalo-Herrera, *et al.*, 2012).

En Sudamérica, la presencia de complejos de especies y la falta de información del comportamiento del vector es el mayor obstáculo para identificar el rol que tienen las

diferentes especies de anofelinos en la transmisión de malaria y para determinar las estrategias de control contra la malaria en la región (Arevalo-Herrera, *et al.* 2012).

### **3.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN**

Existen varios métodos para detectar la malaria en el ser humano, entre los que destacan: la microscopía, los métodos moleculares y las pruebas rápidas.

a) Observación por microscopía de luz: Esta técnica es realizada mediante la observación de un frotis sanguíneo o gota gruesa en el microscopio y estima la densidad de los parásitos en estadios asexuales (Bousema & Drakeley, 2011; Nakanjako, *et al.*, 2011). Típicamente, el diagnóstico es ejecutado por este método por ser económico y confiable (Koita, *et al.*, 2012). La microscopía es el método recomendado para las personas que son sospechosas de estar enfermas antes de que se les administre tratamiento (Nakanjako, *et al.*, 2011). Es una prueba muy específica que funciona correctamente cuando la parasitemia es mayor a 1000 parásitos/ $\mu$ l pero puede detectar hasta 5 parásitos/ $\mu$ l, en el caso de microscopistas expertos (Campos, *et al.*, 2011; Tangpukdee, *et al.*, 2009). La microscopía de sangre periférica se usa para la descripción de especies. Este método puede ser afectado por la calidad de la preparación de la muestra y la experiencia del lector, entre otros factores (Campos, *et al.*, 2011).

b) Métodos moleculares: Estos son procedimientos basados en la caracterización de moléculas de ácidos nucleicos, que permiten distinguir e identificar a microorganismos basándose en las diferencias de sus genotipo. Permiten diagnosticar rápidamente enfermedades infecciosas para las cuales el diagnóstico convencional no puede ser usado o no da resultado (Negroni, 2009). Estos métodos se realizan mediante el uso de herramientas como la PCR (reacción en cadena

de la polimerasa) (Zoghi, *et al.*, 2012). Para detectar al parásito, se pueden usar variaciones de esta técnica, tales como la PCR anidada, que detecta hasta 1 parásito/ $\mu$ l (Snounou, 1996; Campos, *et al.*, 2011). Con el uso de la PCR anidada se determina la especie de *Plasmodium* mediante la amplificación del gen 18S que se encuentra en la subunidad ribosomal pequeña de RNA (Bousema, *et al.*, 2014). Además se utilizan varios métodos de PCR en tiempo real, como son la PCR de transferencia de electrones fotoinducidos (PCR-PET) o la PCR anidada en tiempo real. La PCR en tiempo real es una técnica que depende del uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La cuantificación del amplicón se hace simultáneamente por el cambio en la señal de fluorescencia que es medida por un aparato que combina la amplificación del ácido nucleico diana y la fluorescencia del producto (Forbes, *et al.*, 2009). La PCR-PET depende del uso de fluoróforos o de colorantes fluorescentes de intercalación del ADN. Los primers han sido modificados en su extremo 5' con la adición de un oligonucleótido de 17 bases que está marcado con un fluoróforo (HEX o FAM). En el caso de que no se produzca amplificación, la cola forma un bucle que extingue la fluorescencia debido a la proximidad de las cuatro bases nitrogenadas, guaninas (G's), esto pasa por el mecanismo de transferencia de electrones fotoinducidos (PET) (Lucchi, *et al.*, 2013). La PCR anidada en tiempo real es una técnica que tiene dos pasos: en primer lugar detecta el género del parásito con primers que tienen como blanco al gen *Plasmodium cytochrome b*; y, el segundo paso consiste en la determinación de la especie, con primers que tienen como blanco el mismo fragmento de un gen y un fragmento de un gen específico de cada especie (Canier, *et al.*, 2013). Estudios han demostrado que la PCR tiene una sensibilidad de al menos 3,3 veces mayor a la microscopía (Campos, *et al.*, 2011).

c) Pruebas rápidas (RDTs): Son dispositivos de inmunocromatografía lateral de flujo que detectan antígenos específicos del parásito *Plasmodium* en muestras de sangre (Akinyi, *et al.*, 2013). Estas pruebas han adquirido mayor importancia porque tienen como objetivo mejorar la precisión de diagnóstico en zonas donde la mayoría de la población se encuentra en riesgo de transmisión (Gamboa, *et al.*, 2010). Estas pruebas son fáciles de usar y los resultados se obtienen entre 15 y 20 minutos sin necesidad de electricidad, equipo caro o amplia formación de la persona que realiza la prueba (Gamboa, *et al.*, 2010). Las RDTs pueden detectar parasitemias de 100 parásitos/ $\mu$ l, sin embargo, a parasitemias menores la sensibilidad puede variar (Baker, *et al.*, 2010; Degese, 2009). Los blancos más comunes que usan en las pruebas comerciales son: - proteína rica en histidinas 2 (HRP2), - lactato dehidrogenasa (LDH) y - aldolasa. Las pruebas rápidas que tiene como blanco la aldolasa y la lactato dehidrogenasa son panespecíficas, pueden detectar más de una especie, mientras que si el blanco es HRP2 es específica para una proteína única de *Plasmodium falciparum* (Akinyi, *et al.*, 2013). Actualmente, existen más de 50 marcas en el mercado, con más de 150 productos individuales de los cuales algunos solo detectan *P. falciparum*, otros detectan, además de *P. falciparum*, otras especies del género (Gamboa, *et al.*, 2010). Son usadas en 40 de los 97 países endémicos tanto para, detectar tanto *P. falciparum* como *P. vivax* (WHO, 2014).

### 3.3.1 PfHRP2 y PfHRP3

La mayoría de pruebas rápidas detectan a la proteína rica en histidinas (HRP2), esta proteína se produce durante el estadio asexual del parásito *P. falciparum* (Abdallah, *et al.*, 2014). La proteína está codificada en un gen de copia simple subtelomérico, de 1 063 pares de bases, se encuentra en el cromosoma 8, posee 34% de histidinas, 37% de alaninas y 10% de ácido aspártico (Baker, *et al.*, 2010; Akinyi, *et al.*, 2013). PfHRP2 es una proteína soluble en agua

de 60 – 105 kD que es sintetizada en la fase asexual del ciclo, identificada como una proteína de superficie de los eritrocitos infectados (Baker, *et al.*, 2010). Además, las secuencias de aminoácidos deducidas de PfHRP2 de diferentes aislados son altamente polimórficas, por lo que el número y la secuencia de repeticiones específicas presentes en la proteína PfHRP2 varía ampliamente (Gamboa, *et al.*, 2010), estas son principalmente las secuencias AHH y AHHAAD (Baker, *et al.*, 2010). Estas características le hacen un buen blanco para la detección de *P. falciparum* en las pruebas rápidas (Baker, *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha observado que en algunas cepas de *P. falciparum* puede ocurrir delección de PfHRP2. La delección se da especialmente en cultivos *in vitro* de estadios asexuales de *P. falciparum* que han sido mantenidos por largo tiempo, lo que está relacionado con la localización del gen en la zona subtelomérica (Koita, *et al.*, 2012). La delección de este gen no se había documentado en la naturaleza hasta el 2010 en que se reportaron delecciones en las cepas de *P. falciparum* de la Amazonia peruana (Gamboa, *et al.*, 2010; Akinyi, *et al.*, 2013). Koita, *et al.* en el año 2012 reportaron que las delecciones del gen *Pfhrp2* se presentan también en Papua Nueva Guinea y indica que la ausencia del gen produce falsos negativos en las RDTs. En la zona amazónica de Colombia también se han reportado casos de parásitos que presentan la delección (Murillo, *et al.*, 2015). Existen varias hipótesis de la existencia de parásitos *P. falciparum* con la delección del gen *Pfhrp2*, una de ellas indica que una posibilidad es que el cambio de las drogas del tratamiento pudo haber favorecido la expansión de estos parásitos (Akinyi, *et al.*, 2013).

El gen *Pfhrp3* codifica para la proteína rica en histidina 3 (HRP3) que es también conocida como la pequeña proteína rica en histidina (SHARP), el gen está localizado en el cromosoma 13 cerca de uno de los telómeros. El gen *Pfhrp3* tiene una estructura similar al gen *Pfhrp2*, al

igual que *Pfhrp2*, *Pfhrp3* contiene una secuencia de señal péptida en el exón 1 seguida por un intrón. El exón 2 del gen codifica para las repeticiones del aminoácido rico en histidina que comienzan de 75 a 90 nucleótidos luego del inicio del exón (Baker, *et al.*, 2010).

PfHRP3 es un polipéptido de 30 a 35 kDa, contiene 30% de histidina y 29% de alanina. En la región principal de codificación de la proteína existen dos regiones que tienen unidades repetidas en tándem, estas dos regiones están separadas por un región de 72 nucleótidos que no contienen unidades repetidas. No se tiene claro cual es el rol de esta proteína en la supervivencia del parásito (Sharma, 1988).

Evidencia demuestra que PfHRP2 es el blanco principal detectado por RDTs pero PfHRP3 puede ser detectado por los anticuerpos monoclonales que reconocen a PfHRP2 en RDTs. El papel de PfHRP3 en el rendimiento de las pruebas de diagnóstico de PfHRP2 no está bien definido (Gamboa, *et al.*, 2010; Baker, *et al.*, 2010).

La delección de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en los cromosomas 8 y 13, respectivamente, en los parásitos *P. falciparum* podría estar afectando a las RDTs porque los resultados podrían ser falsos negativos a falta de estos genes, el blanco de la RDT, en los parásitos es consecuencia de la delección de estos genes de los respectivos cromosomas. La delección de estos dos genes ha sido reportada previamente en líneas de laboratorios como Dd2 (delección de PfHRP2), HB3 (delección de PfHRP3) y 3BD5 con doble delección (Gamboa, *et al.*, 2010).

### **3.4 HISTORIA DE LA MALARIA**

La malaria es una enfermedad muy antigua, que ha afectado a la población humana desde hace miles de años. Se piensa que en la prehistoria los humanos ya sufrían esta enfermedad (García,



2007). El origen del paludismo causado por *P. falciparum* es África y data de hace 4 a 7 millones de años (Pacheco, *et al.*, 2012), desde donde se dispersó al Mediterráneo, la India y Asia Suroriental, mediante las migraciones humanas (Cox, 2010), aunque aún no se tiene total seguridad de como se dispersó exactamente (Yalcindag, *et al.*, 2012). Se han documentado casos de paludismo en China, hacia el año 2700 A.C, en Mesopotamia desde el 2000 Antes de Cristo (A.C.), en papiros egipcios desde 1570 A.C. y en textos hindúes desde el siglo VI A.C. (Cox, 2010).

En el siglo V A.C., Hipócrates describió los síntomas de la malaria y asoció la enfermedad con los vapores y emanaciones fétidas de los pantanos y esteros, la disminución de casos estaba relacionada con la desecación de éstos; idea que se mantuvo por veinticinco siglos (García, 2007). De este pensamiento nace la palabra malaria, viene del italiano mal'aria que quiere decir “mal aire” (Cox, 2010).

En 1880, Laveran descubrió estadios asexuales y gametocitos de *P. falciparum* (García, 2007). Estos estadios, según las observaciones de Laveran, eran leucocitos con pigmento y cuerpos esféricos pigmentados de diferente tamaño y con movimientos ameboides, libres o estaban adheridos a las células (Zuckerberg & Barcat, 2007). Diez años después, Ross descubrió el vector de la enfermedad, encontró los parásitos de *P. falciparum* en el estómago de mosquitos anofelinos que habían picado a enfermos de malaria (CDC, 2012).

Los esfuerzos para controlar y eliminar la malaria a gran escala datan de finales del siglo XIX, y durante la primera mitad del siglo XX, cuando 178 países eran endémicos para la enfermedad. Sin embargo, poco se pudo hacer, principalmente porque los esfuerzos fueron suspendidos por la Primera y Segunda Guerra Mundial (Feachem, *et al.*, 2010).

Durante la Segunda Guerra Mundial, se utilizaron insecticidas de acción residual, como el DDT, para controlar al vector. En 1955, la Organización Mundial de la Salud (WHO) puso en marcha el Programa de Erradicación de la Malaria. Algunos países como Estados Unidos y Cuba lograron eliminar al paludismo pero la mayoría de países participantes no lo lograron por diversas causas como resistencia de los mosquitos a los insecticidas, elevados costos operacionales, la falta de financiamiento y la resistencia del parásito a cloroquina (García, 2007; Bloland, 2001).

### 3.5 MALARIA EN LATINOAMÉRICA

Se cree que *P. falciparum* fue introducido en las Américas por inmigrantes europeos y por el comercio de esclavos durante los primeros 300 años después de la colonización europea, esto está basado en evidencia genética y arqueológica (Yalcindag, *et al.*, 2012). Sin embargo, existen otras hipótesis que sugieren que la malaria causada por *P. falciparum* estaba presente en América del Sur mucho tiempo antes de la llegada de los esclavos (Yalcindag, *et al.*, 2012) (Fig. 3). En el caso de *P. vivax*, un estudio realizado usando el gen mitocondrial “citocromo b” dio como resultado una filogenia que sostiene la hipótesis de que *P. vivax* pudo originarse de un parásito de un mono en América del Sur (Escalante, *et al.*, 2005).

Las invasiones de Pizarro y Gonzáles a Perú en el siglo XVI propagaron la malaria entre las poblaciones Incas (Griffing, *et al.*, 2013b). Una hipótesis que apoya la presencia desde hace mucho tiempo de *P. falciparum* en América del Sur es la “Hipótesis de la víspera de la malaria” (Malaria’s eve) la cual dice que todas las poblaciones de *P. falciparum* actuales tienen un ancestro común que proviene de un solo precursor que vivió hace miles de años. Esta hipótesis está basada en la falta de mutaciones silentes de muchos genes que posee el

parásito, lo que se debe a que el parásito pasó por un severo cuello de botella hace unos pocos miles de años. La edad del parásito data del tiempo de la separación entre el humano y el chimpancé, el mismo tiempo de divergencia entre *P. falciparum* y *P. reichenowi*, parásito del chimpancé, hace unos 8 millones de años (Gauthier & Tibayrenc, 2005).

A inicios del siglo XX, cuando 178 países en el mundo eran endémicos para la malaria, en América del Sur comenzó el control de la población de mosquitos, mediante el uso de mosquiteros, fumigación de las casas, presencia de techos de metal y con el drenaje o el rociado de aceite o de “Paris Green” en el agua (Griffing, *et al.*, 2013b; Feachem, *et al.*, 2010).

En el continente Americano, existen aproximadamente 120 millones de personas, en 21 países, que están en riesgo de transmisión de malaria y 25 millones están en alto riesgo. El número de casos confirmados en América ha disminuido de 1.2 millones en el 2000 a 427 000 casos en el 2013. Se ha reportado una reducción en la incidencia de malaria de más del 75% en 13 de los 21 países en los que persistía la transmisión en los años 2000 al 2012. Se han reportado 82 muertes en el 2013, un 79% menos que en el año 2000 (WHO, 2014).

En América del Sur, existen 12 países que presentan malaria: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guayana, Paraguay, Perú, Surinam, Venezuela y Guyana Francesa (WHO, 2014). La mayoría de casos que se reportan se producen en la zona amazónica (Cruz, *et al.*, 2013). En el continente, en el 2014, la mayoría de casos fueron producidos por *P. vivax* (aproximadamente el 70% de los casos), seguido por *P. falciparum* (aproximadamente 30%). En el 2013, el 42% de los casos se produjeron en Brasil, el 18% en Venezuela y Colombia presentó el 12% de los casos (WHO, 2014).

Cerca del 90% de los casos son originarios de la zona amazónica (Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guinea Francesa, Perú, Surinmán y Venezuela) y el otro 10% está constituido de regiones no amazónicas, región andina (2%) y Centro América (4.1%) (Arevalo-Herrera, *et al.* 2012).

Durante el Programa Global de Erradicación de la Malaria, de 1955 a 1969, varios países de Latinoamérica hicieron progresos significativos en el proceso de eliminación de la enfermedad. Incluso países altamente endémicos, como Venezuela, Colombia, Perú y Panamá, redujeron significativamente la transmisión de la malaria (Herrera, *et al.*, 2012). Sin embargo, a lo largo del siglo XX, el continente se sometió a un proceso de desarrollo que dio como resultados migraciones por todo el continente. Esto produjo un aumento de la prevalencia de la malaria y la incidencia en los años 1969 y 1980 (Carter & Mendis, 2002) (Herrera, *et al.*, 2012).

La WHO, en el año 2009, informó que desde el año 2000 se ha presenciado una disminución sustancial en la incidencia de malaria por el funcionamiento de las políticas regionales y por el esfuerzo por mejorar la vigilancia de la enfermedad, la detección temprana de los casos y la administración de los tratamientos. Programas de control de la enfermedad como: “Programa de Control de la Malaria en las Regiones Fronterizas de los Países Andinos” (PAMAFRO), “El Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria”(Fondo Mundial), entre otros, han influido de manera significativa en el índice parasitario anual (IPA) en esta región. En países de la región mesoamericana ha disminuido la malaria en un 90% por las actividades de control (Salud Mesoamérica, 2015).

En dos países (Guyana y Venezuela) se registró un aumento en el número de casos entre el 2000 y 2013. En Haití, el número de casos de malaria aumentó, pero no está claro si el aumento es real o es simplemente debido a los cambios en el alcance de las pruebas de diagnóstico y elaboración de informes. Argentina, que está en la fase de eliminación ha reportado cero casos desde 2011, y ha iniciado el proceso de certificación de la eliminación de la malaria. Paraguay, está en fase de pre-eliminación, ha reportado cero casos autóctonos y 11 casos importados desde 2012. Costa Rica reportó dos casos de recaída en el año 2013 y cuatro casos importados; se espera que Costa Rica y Paraguay entren en fase de eliminación, como Argentina. Otros cuatro países en fase de pre-eliminación reportaron menos de 1 000 casos en el 2013 (Belice - 20 casos por *P. vivax*, Ecuador - 360 *P. vivax* y *P. falciparum*, El Salvador - 5 por *P. vivax*; y México – 495 por *P. vivax*). Diez países de América Central y el Caribe se han sumado a una iniciativa regional que tiene como objetivo eliminar la malaria en el 2020, con el apoyo del Fondo Mundial (WHO, 2014).

### **3.6 MALARIA EN ECUADOR**

En Ecuador, la malaria se presenta en la Costa y la Amazonia (MSP, 2015), la incidencia de la malaria ha sido irregular y ha estado asociada a las condiciones climáticas y a las deficiencias sanitarias (Valenzuela, 2013). En el año 2001, se reportaron cerca de 105 000 casos (MSP, 2011). Desde el año 2001 al 2012 los casos de malaria disminuyeron en un 99% (MSP, 2013) y se considera que el país se encuentra en una etapa de pre-eliminación (WHO, 2014).

En Ecuador, en el año 2013, del total de casos, el 43% fue causado por la especie *P. falciparum*, mientras que casos causados por la especie *P. vivax* representaron al 57%. En el 2014 el 17% de los casos fue causado por *P. falciparum*, mientras que el 83% de casos

causados fueron por *P. vivax* (SNEM, 2014). En el 2013 se registraron 378 casos, y en el 2014 se registraron 243 casos mientras que en los vecinos países de Perú y Colombia se reportaron 43 468 y 51 696 casos, respectivamente (WHO, 2014; SNEM, 2015). La disminución de los casos se asocia a la respuesta inmediata a la enfermedad y a la aplicación de las normas de vigilancia que realizó el Ministerio de Salud Pública y el Servicio Nacional de Control de Enfermedades transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM) (MSP, 2013).

En Ecuador, existían 264 puestos de diagnóstico, que estaban ubicados en zonas consideradas de riesgo de contagio. Para mantener a la enfermedad bajo control, el gobierno cumplía con actividades como: control de calidad en la gestión de diagnóstico microscópico, disponibilidad de medicamentos antimaláricos, tratamiento integral, seguimiento de los casos positivos, control y seguimiento de pacientes considerados en riesgo (menores de 5 años, embarazadas y adultos), fumigación en el interior y donación de mosquiteros impregnados con insecticida en lugares donde existía transmisión (MSP, 2013).

A pesar de la disminución en el número de casos de malaria, en los últimos años se han producido brotes tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax*, en diferentes localidades de Ecuador. Desde noviembre del 2012 hasta noviembre del 2013, ocurrió un brote de *P. falciparum* en la ciudad de Esmeraldas, provincia de Esmeraldas. Un total de 151 casos fueron reportados (Sáenz, *et al*; en prensa). Un brote más reciente de *P. falciparum*, se produjo en las localidades de Tobar Donoso, provincia de Carchi, y el Guadual, provincia de Esmeraldas, desde mediados del mes de marzo hasta mediados del mes de mayo del 2015, donde se reportaron 78 casos confirmados (MSP, 2015). Similarmente, un brote de *P. vivax* se produjo en la Amazonia, desde finales de enero hasta mediados de mayo del 2015, en el cantón

Aguarico, provincia de Orellana, se reportaron más de 100 casos confirmados en este brote (MSP, 2015).

En Ecuador, existen múltiples vectores anofelinos que se encuentran establecidos en zonas altas y bajas del país (revisado por Pinault&Hunter, 2012; WHO, 2014). Algunos de los vectores anofelinos reportados son los mosquitos *An. albimanus*, *An. punctimacula*, *An. pseudopunctipennis* en la Costa y estribaciones andinas (Pinault&Hunter, 2012b)(WHO, 2014) y *An. oswaldoi* en la Amazonia (Pinault&Hunter, 2011).

### **3.7 DROGAS ANTIMALÁRICAS Y RESISTENCIA**

A las drogas usadas para el control de la malaria se las ha dividido como: i) Derivados quinolónicos, ii) antifolatos, iii) derivados de la artemisinina y iv) antibióticos. En el primer caso, la droga interfiere en la transformación del grupo hemo en hemozoína mediante la inhibición de la actividad de la hemo-polimerasa que se encuentra en la vacuola alimenticia, en el parásito; ejemplos son la cloroquina y lumefantrina. Los antifolatos tienen acción sobre los estadios intraeritrocitos, la pirimetamina y sulfonamida son ejemplos. Los derivados de las artemisininas actúan sobre la vacuola alimenticia, no permiten la conversión del grupo hemo a hemozoína, la dihidroartemisinina es un ejemplo. Los antibióticos aumentan la acción esquizotónica sanguínea, la clindamicina es un ejemplo de este grupo (Chassaigne, 2001).

Algunas de las drogas usadas para el tratamiento de la malaria son: Quinina (QN), cloroquina (CQ), mefloquina (MQ), artemisininas (ARTs) y sulfadoxina pirimetamina (SP). La QN fue descubierta en el siglo XVII y fue usada desde los 1600s hasta la Primera Guerra Mundial; la QN es un compuesto de la corteza del árbol de Cinchona (*Cinchona officinalis*). La corteza de este árbol se usaba para tratar los casos de malaria a principios del siglo XVII, en América del

Sur (Achan, *et al.*, 2011; Greenwood, 1992), sin embargo sigue siendo un medicamento importante para combatir la malaria severa (Achan, *et al.*, 2011). La CQ fue descubierta en Alemania, por Hans Andersag: en 1946 la CQ fue reconocida y establecida como antimalárico efectivo y seguro (CDC, 2012). La CQ inhibe la actividad de la hemo-polimerasa en la vacuola alimenticia del parásito, interfiere en la conversión del grupo hemo en hemozoína; se la usó contra las cuatro especies de *Plasmodium* que producen malaria en el ser humano (Chassaingne, 2001). La MQ es un esquizonticida hemático que resulta eficaz contra las formas hepáticas asexuales de todos los parásitos de la malaria (WHO, 1996). En 1984, en Tailandia fue introducida pero en seis años presentó resistencia, razón por la cual fue sustituida (Price, *et al.*, 2004). Al inicio de la década de los 70s se aisló y caracterizó a la artemisina (ART), del extracto de la planta de qinghao, por científicos chinos durante la guerra de Vietnam (Hsu, 2006; Liang & Fang, 2006). Esta droga es un esquizonticida hepático potente y rápido pero es menos potente que sus derivados y esto lleva a tener que administrarlo en mayores dosis (WHO, 1996). Muchos de los países que tienen casos de *P. falciparum* han adoptado los tratamientos que tiene como primera línea la terapia basada en combinaciones de artemisininas (ACTs), si los casos son de malaria no complicada (WHO, 2014). La SP es producto de dos compuestos que actúan sinérgicamente como inhibidores del metabolismo del ácido fólico, y son efectivos contra *P. falciparum* y *P. vivax* (WHO, 1996). SP fue introducida, en América del Sur, en los 70s (Bacon, *et al.*, 2009; Corredor, *et al.*, 2010). La pobre calidad de los medicamentos tiene un efecto muy grande en la calidad de vida del paciente, es decir, los pacientes pasan más tiempo enfermos, además de gastar más tiempo y recursos en el tratamiento (Pribluda, *et al.*, 2012).



La resistencia a drogas antimaláricas se define como la habilidad que posee una determinada cepa del parásito para sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de la droga en la dosis recomendada. Es importante tener claro que la “resistencia a drogas antimaláricas” no necesariamente es lo mismo que “tratamiento fallido”, en el segundo caso es un fracaso en la eliminación de la parasitemia y/o en la eliminación de los síntomas clínicos a pesar de la administración de la droga antimalárica; mientras que la resistencia puede conducir al fracaso del tratamiento. Además existen otros factores que aceleran la propagación de la resistencia de los antimaláricos como: el incumplimiento del tratamiento, la mala calidad de las drogas administradas, las interacciones con otras drogas y el mal diagnóstico de la enfermedad (WHO, 2010).

La distribución de la resistencia de los antimaláricos ha sido documentada para *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. vivax*. En *P. falciparum* se ha observado resistencia en los antimaláricos que se usan usualmente [cloroquina (CQ), amodiaquina (AQ), mefloquina (MQ), quinina (QN) y sulfadoxina-pirimetamina (SP)] y, recientemente, se ha detectado resistencia en los derivados de la artemisinina, en la frontera entre Cambodia y Tailandia. En el caso de *P. vivax*, se ha desarrollado resistencia rápidamente en algunas áreas a SP, mientras que la resistencia a CQ ha sido confirmada en Indonesia, Papúa Nueva Guinea, Timor del Este y otras partes de Oceanía. También se ha reportado en Brasil y Perú. La mayoría del Sureste Asiático, el subcontinente Indio, la península de Corea, el Medio Oriente, el noreste de África y mucho de Sur y Centro América tienen remanentes de *P. vivax* sensitivo a CQ (WHO, 2010).

En estudios realizados en Ecuador (Saenz *et al.*, 2015; Valenzuela, 2013) con muestras de *P. falciparum* procedentes de la ciudad de Esmeraldas se determinó que *P. falciparum* presenta resistencia a CQ y posible resistencia a QN.

### 3.8 LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA

La vacuna contra la malaria es considerada como una de las modalidades potenciales para la prevención de la malaria y la reducción de la transmisión de la enfermedad. La búsqueda de la vacuna se viene realizando por aproximadamente 50 años; sin embargo, ha sido durante los últimos 10 años que la investigación y desarrollo en este campo ha sido un área de intenso esfuerzo por parte de varios grupos (WHO, 2014b). Con el aumento de financiamiento en los últimos años, han llegado 40 proyectos de vacunas a la fase de prueba clínica (Schwartz, *et al.*, 2012), y, a partir de julio del 2014 cuatro vacunas han sido sometidas a ensayos de campo, donde tres de las cuatro llegaron a la fase 2 y la última está en fase 3 (WHO, 2014b).

El complejo ciclo de vida del parásito provee varios potenciales sitios de acción para el diseño de una vacuna. En los últimos años, se han identificado varios antígenos candidatos para vacunas. Existen cinco tipos de vacunas que se están desarrollando y están basadas en diferentes estadios del ciclo de vida del parásito: i) pre-eritrocíticas; ii) estadios de la sangre; iii) vacunas de bloqueo de transmisión; iv) vacunas multi-estadios, multi-antígenos; y v) vacunas vivas atenuadas (Shi, *et al.*, 1999; Thera & Plowe, 2012).

Entre las vacunas pre-eritrocíticas se encuentra RTS, S / AS01, la cual fue aprobada por la Agencia Europea de Medicia (EMA) en el mes de julio del presente año (EMA, 2015), tiene como blanco a la proteína CSP de *P. falciparum*. CSP contiene una región de repetición central que provoca respuestas de anticuerpos, que se encuentra entre dos regiones no repetitivas que contienen epítomos de células T. Los anticuerpos dirigidos contra la región central de repetición causan el despredimiento de la proteína y el bloqueo de la invasión a los

hepatocitos, lo que sugiere que los anticuerpos inducidos por la vacuna podría prevenir la infección (Thera & Plowe, 2012).

La mayoría de las vacunas basadas en estadios de la sangre se basan en antígenos que recubren la superficie de los merozoítos invasivos y/o están involucrados en el proceso de invasión a los eritrocitos. Se busca que la inmunización con estos antígenos generen anticuerpos que bloqueen la invasión y reduzcan la replicación del parásito en la sangre, reduciendo el riesgo o la gravedad de la enfermedad clínica (Thera & Plowe, 2012). La proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP1) fue la primera proteína entre varias proteínas de superficie de merozoítos en ser caracterizada, además el gen que codifica para la proteína MSP1 en *Plasmodium* spp. es uno de los genes más estudiados para la elaboración de vacunas (Thera & Plowe, 2012; Hellgren, *et al.*, 2013).

Las vacunas de bloqueo de transmisión están destinadas a bloquear la transmisión de moléculas diana que son exclusivas de gametocitos o en etapas posteriores en el mosquito (Thera & Plowe, 2012). Los anticuerpos dirigidos contra estos objetivos son capaces de bloquear el desarrollo de las etapas del parásito en el mosquito, por lo tanto interrumpen la transmisión (Carter, 2001; WHO, 2000).

En cuanto a vacunas multi-estadios existen dificultades por la naturaleza de los parásitos *Plasmodium* spp., porque estos parásitos son grandes y complejos, provocan respuestas inmunes complejas y multifacéticas. Varios intentos se han hecho para mejorar la eficacia de las vacunas contra un antígeno mediante el desarrollo de estas (Thera & Plowe, 2012).

Las vacunas vivas atenuadas son aquellas que actúan contra todo el organismo. Éstas fueron las primeras y, para algunos organismos, son las mejores vacunas. Aves y monos habían sido

protegidos por vacunas vivas atenuadas en los primeros estudios de la vacuna (Thera & Plowe, 2012; Lorenz, *et al.*, 2014).

El tamaño del genoma del parásito es mucho mayor que el de la mayoría de los virus y de las bacterias para las que se han desarrollado vacunas con éxito. Muchos de estos genes se expresan diferencialmente durante las diversas etapas del ciclo de vida tanto en huéspedes vertebrados como en el mosquito. Además, las mutaciones que se generan durante la reproducción mitótica en el hígado y etapas de sangre, y la recombinación genética durante las etapas reproductivas sexuales producen una amplia diversidad genética lo que complica la elección de antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas (Thera & Plowe, 2012).

### **3.9 ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS PARÁSITOS DE LA MALARIA**

#### **3.9.1 GENÉTICA DE POBLACIONES**

La genética de poblaciones estudia el cambio en la abundancia de características hereditarias a través de las generaciones. La variación que se observa en estas características es producto de las mutaciones al azar que se producen en las secuencias de ADN. El aumento de la variación genética está directamente relacionado con el aumento de la recombinación durante la reproducción sexual; la recombinación puede producir nuevas combinaciones de genes (Curtis, *et al.*, 2008).

Existen dos procesos responsables de la variación genética: la selección natural y la deriva génica. La selección natural es un proceso evolutivo donde los organismos mejor adaptados desplazan a los menos adaptados por una lenta acumulación de cambios genéticos favorables en la población a lo largo de las generaciones; si este proceso actúa sobre un número muy

grande de generaciones puede producir la formación de una nueva especie. El segundo proceso, la deriva genética, es una fuerza evolutiva que modifica las frecuencias alélicas y produce cambios evolutivos al azar lo que da como resultado cambios en el acervo genético a lo largo de las generaciones de una población (Kutschera & Nikla, 2004). Estos procesos dependen del tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ), número de individuos en edad reproductiva, este tamaño siempre será menor al tamaño real de la población (Del Castillo, *et al.*, 2014). Para indicar el grado de diferenciación entre 2 ó más poblaciones se usa el índice de fijación  $F_{st}$ , mientras más cercano a cero sea el  $F_{st}$ , menor diferenciación existirá entre las poblaciones comparadas. El valor del  $F_{st}$  es inversamente proporcional al flujo genético existente entre poblaciones (Nei, 1973; Martínez & Figueras, 2012).

Para medir la diversidad genética existente en una población se usan herramientas como: la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), la posesión de un par de alelos diferentes en un locus determinado (Reece & Hobbins, 2010); la tasa de polimorfismo genético, la variación genética observada en las poblaciones. Una población polimórfica presenta ventajas a la supervivencia de los individuos, en determinadas condiciones ambientales (Passarge, 2010). Un factor a tomar en cuenta es el desequilibrio de ligamiento (LD), situación en la que algunos haplotipos son mucho más frecuentes de lo que correspondería solo al azar, mientras más cercanos se encuentren dos genes, menor probabilidad de que se produzca recombinación (Solari, 2007; Oliva, *et al.*, 2004).

### 3.9.2 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son herramientas que pueden identificar y caracterizar genotipos determinados. Los marcadores se diferencian por la capacidad que poseen para detectar

polimorfismo en los loci de interés. Algunos ejemplos son: polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs), microsatélites, secuencias repetidas intersimples (ISSRs), polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) y polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) (Avisé, 2012).

Los microsatélites son repeticiones de motivos, en tándem, de dos, tres, cuatro, ocho o más nucleótidos. La variación tan grande que se encuentra en la mayoría de las secuencias de microsatélites da como resultado múltiples alelos por locus, la mayoría generados por un evento de deslizamiento durante la replicación del ADN. La tasa de mutación observada es de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  por locus por generación debido a eventos de deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN. Estos marcadores son muy usados en laboratorios para el estudio de la estructura poblacional de los parásitos que causan la malaria (Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2013). Los microsatélites neutrales son producto de la replicación por deslizamiento, (Russell, *et al.*, 2006), estos son usados, preferentemente, en estudios de caracterización poblacional porque poseen herencia co-dominante, reproducibilidad de resultados, naturaleza muti-alélica, una localización específica en el cromosoma y distribución genómica amplia (Parida, *et al.*, 2010).

Los marcadores microsatelitales tienen varios usos como: determinación de la herencia de rasgos procedentes de un cruce genético, comparación del perfil genético entre poblaciones de diferentes zonas endémicas, detección de infecciones multiclonales, distinción entre una infección anterior y una nueva infección, comparación del nivel de diversidad genética en poblaciones simpátricas o en diferentes especies y seguimiento del origen geográfico de una infección (Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2013).

Para usar microsatélites es necesario entender cómo evolucionan las secuencias, es decir, necesitamos conocer la tasa de mutación, el tamaño de la mutación y el tipo de rearrreglo que genera la variación en longitud (Anderson, *et al.*, 2000). En *P. falciparum* la distribución de microsatélites es muy amplia, cada 2-3 kb a lo largo del genoma, tanto en zonas codificantes como en zonas no codificantes (Anderson, *et al.* 1999; Anderson, *et al.*, 2000b). Se han identificado 901 microsatélites en *P. falciparum* que están aislados y mapeados (Anderson, *et al.*, 2000). La evidencia génica es de gran ayuda para poder develar la procedencia y estructuración de las poblaciones de *Plasmodium*, mediante el uso de marcadores moleculares como microsatélites (Yalcindag, *et al.*, 2012).

El genotipo del parásito juega un papel importante en la patogénesis, por lo que se espera que los parásitos estrechamente relacionados tengan una expresión de la enfermedad similar. La forma de realizar la comparación entre los diferentes genotipos es mediante comparación de microsatélites (Ferreira, *et al.*, 2002). Un factor que puede alterar y hacer variar el genotipo del parásito es la fecundación de los gametos. Si los dos son del mismo linaje clonal la progenie no tendrá variación, pero si se unen gametos de diferente linaje clonal la progenie podrá tener variación, por el entrecruzamiento que resulta en una posible recombinación (Anderson, *et al.*, 2000b).

Existen cambios estructurales notables en los microsatélites de *P. falciparum*, algunos de los cambios son resultado de la variación en el largo del microsatélite, principalmente en poblaciones naturales. El excesivo rearrreglo de la secuencia provoca que se generen cambios de secuencias que aparecen en regiones codificantes. Las mutaciones puntuales en microsatélites pueden dar como resultado la generación de repeticiones de minisatélites, marcadores más grandes que los microsatélites, la unidad repetida puede ser de hasta 25 pares

de bases (pb). Estas mutaciones también pueden generar nuevos microsatélites (Anderson, *et al.*, 2000b; Brown, 2008).

### 3.9.3 ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES DE *P. falciparum* EN EL MUNDO

En el siglo XX, se inició la campaña internacional de erradicación de la malaria para eliminar a la enfermedad en algunas regiones del mundo. No se entiende bien como la campaña de erradicación alteró la estructura poblacional de *P. falciparum*. Es probable que la campaña haya condecido a que la población atravesase un cuello de botella (Griffing, *et al.* 2011), lo que podría haber generado que la composición genotípica de la población se altere.

Existen algunos estudios que examinan la estructura poblacional de *P. falciparum* a nivel global. Un claro ejemplo es el trabajo de Anderson, *et al.* 2000b, quienes examinaron muestras de diferentes procedencias (África, Asia, Oceanía y Latino América). En este trabajo, se analizaron 12 diferentes microsatélites que se encuentran en 7 cromosomas diferentes (Campbell & Reece, 2007). Además esos loci seleccionados se usaron para medir la variación alélica y se vio la heterocigosidad, número de individuos que presentan dos alelos diferentes en un locus (Campbell & Reece, 2007), de esta forma se determinó el nivel de diversidad genética, la diferenciación por la procedencia de la muestra e infecciones múltiples (Anderson, *et al.*, 2000; Anderson, *et al.*, 2000b). Los resultados que arrojó este estudio fueron que los países africanos poseen heterocigocidad alta, los países asiáticos intermedia y la más baja en los países latinoamericanos (Anderson, *et al.*, 2000).

Con la ayuda de los microsatélites de las poblaciones, endémicas para la malaria, se ha mostrado que las áreas de baja transmisión tienen menor mezcla de genotipos de parásitos, lo que reduce la tasa de recombinación y la permanencia del desequilibrio de ligamiento en la



zona. Este patrón se produce en muchas poblaciones de América del Sur y el Sudeste de Asia, y una amplia gama de estructuras de la población se puede ver entre los diferentes sitios dentro de cada país como Brasil, Malasia, Tailandia, Filipinas y Papua Nueva Guinea. A diferencia de estas zonas, la mayoría de las infecciones de *P. falciparum* ocurren en África Subsahariana donde la población del parásito es muy diversa, con alta tasa de recombinación y variedad de genotipos (Mobegi, *et al.*, 2012).

En África del Oeste, el incremento de diversidad y complejidad en las infecciones se ha descrito a través de una gradiente de endemicidad desde Mauritania a República de Guinea. Esta variación en la diversidad puede deberse a la variación en el vector y en el hospedero humano, por las migraciones que se dan. El estudio de Oyebola, *et al.* (2014) usaron 12 microsatélites para descubrir la estructura poblacional del parásito en la región. La variación que se observó fue alta, al igual que en los países de la zona, y la diferenciación no fue alta, debido a que existía alta migración en la zona (Oyebola, *et al.*, 2014).

#### 3.9.4 ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES DE *P. falciparum* EN AMÉRICA DEL SUR

En América del Sur, la estructura de las poblaciones estudiadas ha sido analizada con marcadores microsatélites, estos análisis proveen evidencia de que la mayoría de poblaciones de *P. falciparum* son clonales, como en Perú (Griffing, *et al.*, 2011), Ecuador (Sáenz, *et al.*, en prensa), Colombia (Murillo, *et al.*, 2015) y la frontera Honduras-Nicaragua (Larrañaga, *et al.*, 2013), lo que en parte se debe a que la especie atravesó un cuello de botella en la región. Además se propone que la propagación de *P. falciparum* es esencialmente clonal cuando existe baja tasa de transmisión, endogamia y expansiones epidémicas, lo que desencadena que

los parásitos se encuentren fuera del equilibrio de deriva mutacional, el número de mutaciones nuevas no se encuentra balanceado con el número de mutaciones que son eliminadas por la deriva génica (Griffing, *et al.*, 2011; Jobling, *et al.*, 2004). El número de mutaciones de las poblaciones está balanceado por el número de mutaciones que son removidas por deriva génica. La interrupción del desequilibrio de deriva mutacional indica que la población no se ha mantenido estable a lo largo del tiempo (Griffing, *et al.*, 2011).

Una proporción grande de todos los casos de malaria que se presentan en América del Sur ocurren en Brasil. Hubo un incremento gradual en la incidencia entre los años 1970 y principios de los años 1990 (Machado, *et al.*, 2004). Se analizó la estructura poblacional de *P. falciparum* usando herramientas moleculares como SNPs y microsatélites. Griffing, *et al.* (2013) usaron SNP's y encontraron que los parásitos brasileños atravesaron un cuello de botella, lo que sustenta la limitada diversidad genética. Se observó que era imposible clasificar estos parásitos por linajes clonales, debido a que las poblaciones brasileñas mantienen alto tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ), poseen gran cantidad de alelos efectivos que son capaces de pasar a las siguientes generaciones (Griffing, *et al.*, 2013; Machado, *et al.*, 2004; Szpiech & Rosenberg, 2011).

La estructura poblacional de *P. falciparum* se basa en una mezcla y reordenamiento continuos de los linajes de parásitos, debido a la extensa migración entre las diferentes regiones del país, (Udhayakumar, *et al.*, 2013). Además, la presión que generaron las drogas produjo la formación de haplotipos resistentes a las mismas, lo que dio lugar a que se presenten pocos linajes clonales que circulaban en el año (Griffing, *et al.*, 2011). En Venezuela, el año 2003 se encontró cuatro grupos, estos se siguieron encontrando en los siguientes años (Chenet, *et al.*, 2012).

En Perú, la población fue en un principio una mezcla entre los dos grupos de malaria que llegaron con las colonizaciones europeas, el grupo del norte que llegó a Colombia y el grupo del sur que llegó a la Guyana Francesa, Brasil y Bolivia. *P. falciparum* fue casi eliminado del país con la implementación del Programa Nacional de Erradicación de la Malaria, en el año 1957 (Legua, 1994), y fue reintroducido en 1990 (Lopez-Perez, *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Griffing, *et al.* (2011) con muestras colectadas en diferentes localidades de Perú, durante los años 1999 y 2000, se identificaron cinco linajes clonales (A, B, C, D y E) (Griffing, *et al.*, 2011), parásitos que son genéticamente idénticos para un conjunto de marcadores, pero potencialmente variables para los demás (Tibayrenc & Ayala, 2002). La aparición de estos linajes clonales se debe al aumento de la intensidad de transmisión, que favoreció la recombinación y al cambio en la política de uso de medicamentos. Además, se mostró que los linajes clonales pueden mantenerse en simpatría si no existe transmisión suficiente para que dos gametos de linajes diferentes se fusionen. En la Amazonia peruana se encontraron los cinco linajes clonales, mientras que en la zona costera norte se halló solo al linaje clonal E. Se cree que la presencia de todos los linajes clonales en la Amazonia se debe a la falta de una barrera de flujo genético, mientras que la Cordillera de los Andes actúa como una barrera semipermeable para el flujo de genes entre la Amazonia y la Costa (Griffing, *et al.*, 2013). Los linajes clonales A y B no se encontraron en la zona amazónica del oeste ni en la Costa, esto puede estar relacionado con su reciente introducción al Perú; el linaje clonal C se lo puede encontrar en el borde de la cuenca del río Amazonas, este linaje puede ser un vestigio de un linaje amazónico ancestral. Los autores, sugieren que los linajes clonales D y E llegaron a Perú desde Colombia o Ecuador. El linaje clonal E presenta la menor cantidad de variación microsatelital, entre todos los linajes clonales, lo que sugiere que pasó por un cuello poblacional, recientemente (Griffing, *et al.*, 2011).

Perú muestra poblaciones de *P. falciparum* altamente clonales lo que indica que la diversidad genética es baja (Griffing, *et al.*, 2013). Baldeviano, *et al.* (2015) en su estudio sobre un brote de *P. falciparum* que tuvo lugar en Tumbes, Perú, que se produjo en el 2010-2012, determinaron que el brote se produjo por la entrada de un linaje de parásitos que no se encontraba antes en la costa norte peruana, pero que era idéntico a la población de parásitos que se encontró en Loreto (Amazonia) en los años 2009 y 2010 (linaje clonal B): mediante el análisis molecular se determinó que el brote en Tumbes fue producto de la introducción de un parásito multi-resistente que fue aislado de la región amazónica (Baldeviano, *et al.*, 2015).

En Colombia, estudios recientes encontraron que la población de *P. falciparum* ha pasado, por lo menos, por un evento de cuello de botella en el pasado. Las muestras de *P. falciparum* colombianas que se usaron en el análisis dieron como resultado cuatro grupos genéticos principales (Murillo, *et al.*, 2015). Este estudio confirmó lo observado por Echeverry, *et al.* (2013), donde se observó que como resultado existían cuatro grupos de haplotipos, parásitos que son genéticamente idénticos para un conjunto de marcadores, pero potencialmente variables para los demás (Tibayrenc & Ayala, 2002). Las muestras provenían de los departamentos de Cauca, Chocó, Valle y Nariño. La variabilidad genética que mostraron estas poblaciones estaba directamente relacionada entre el grado de endemidad del parásito y la variación genética.

### 3.9.5 ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES EN ECUADOR

En Ecuador, caracterizamos los parásitos de un brote que se produjo en la provincia de Esmeraldas, ciudad de Esmeraldas desde finales del año 2012 hasta finales del año 2013, los cuales eran clonales e idénticos al linaje clonal E de Perú, reportado por Griffing, *et al.* en

2011. Los parásitos pertenecientes a los linajes clonales de Perú fueron reportados en el norte de Perú a finales del siglo XX. El genotipo que presentaron las muestras de Esmeraldas es el mismo genotipo del linaje clonal E y de una muestra colectada hace más de dos décadas. Este resultado apoya la hipótesis de que el brote se produjo a partir de poblaciones vestigiales de *P. falciparum* que circulan en Ecuador (Sáenz, *et al.*, en prensa). La estructura de la población y la constitución genética de *P. falciparum* en Ecuador no está muy bien caracterizada. En Ecuador, el estudio de Sáenz, *et al.* (en prensa) es el único que indica la caracterización molecular de las poblaciones de *P. falciparum*.

Este estudio caracteriza molecularmente a las diferentes poblaciones de *P. falciparum* de distintas partes del país mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites para establecer la procedencia de los haplotipos encontrados, la existencia de migración y la comparación con las poblaciones de países vecinos, además busca comprobar la presencia de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en las muestras ecuatorianas. Los resultados de este estudio contribuirán al conocimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *P. falciparum*, lo que ayudará a generar un diseño de vigilancia de la enfermedad para en un futuro lograr su eliminación del país.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 ÉTICA

Todos los procesos realizados en este trabajo contaron con la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la Pontifica Universidad Católica del Ecuador. Los pacientes que participaron en este estudio firmaron un consentimiento informado (Anexo 1).

### 4.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE *Plasmodium falciparum*

Las muestras utilizadas en el estudio fueron obtenidas por el Servicio Nacional para el Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (SNEM) y fueron tomadas a partir de pacientes que habían sido diagnosticados positivos para malaria por microscopía (Fig. 4). Es importante tomar en cuenta que el número de muestras que fueron estudiadas es representativo de los casos de *P. falciparum* que se reportaron en los años 2013 y 2014.

Las muestras se obtuvieron a partir de sangre venosa del paciente (aproximadamente 5 ml), que se colocaron en círculos de papel filtro Whatman 3MM o Whatman 1 MM (30 µl en cada círculo). Como otra opción, se obtuvieron muestras que se tomaron a partir de punción en el dedo con lanceta y se colocó la sangre directamente en papel filtro Whatman 1MM ó 3MM. La sangre en papel filtro fue utilizada para la extracción de ADN.

### 4.3 CEPAS ESTÁNDAR DE *P. falciparum*

Se usaron las cepas estándar W2, Dd2, 3D7, NF54 y HB3 como controles experimentales. Las cepas W2 y Dd2 son originarias de Indochina. Las cepas NF54 y 3D7 provienen de un paciente que venía de África, en el aeropuerto de Ámsterdam y la cepa HB3 es originaria de

Honduras (Anderson, *et al.* 2000). Las cepas W2, 3D7 y NF54 fueron donadas por el Dr. Dennis Kyle, Universidad de South Florida y cultivadas en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Crónicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por métodos anteriormente publicados (Moll, *et al.*, 2013). Las cepas Dd2 y HB3 fueron obtenidas mediante colaboración con el Dr. Venkatachalam Udmayakumar del Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC).

#### **4.4 EXTRACCIÓN DE ADN**

La extracción de ADN se realizó por tres métodos detallados a continuación:

##### **4.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE PAPEL FILTRO UTILIZANDO Chelex-100**

La extracción de ADN de las muestras de papel filtro se realizó con Chelex-100 (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). Se cortó el papel filtro impregnado con sangre y se añadió a 200 µl de Chelex-100 al 5% que previamente fue calentado a 80 °C durante 2 minutos. Se calentó todas las muestras a 100 °C por 10 minutos; a continuación se centrifugó a 13 500 rpm durante 1,5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se lo pasó a un tubo nuevo de 1,5 ml (protocolo Army Malaria Institute, Australia).

##### **4.4.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE PAPEL FILTRO POR KIT**

La extracción de ADN de las muestras de papel filtro se realizó con el QIAamp DNA MINI KIT (QIAGEN Sample & Assay Technologies. Germantown, MD, USA). Se colocó la muestra de sangre de papel filtro en trozos en un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 180 µl de buffer tissue lysis (ATL), se incubó a 85 °C por 10 minutos y se adicionaron 20 µl de la

solución proteinasa K. Se procedió a incubar a 56 °C por 1 hora y se agregaron 200 µl de buffer lysis (AL) a la muestra. Posteriormente se volvió a incubar a 70 °C por 10 minutos y se adicionaron 200 µl de etanol 100% a la muestra. Se colocó la muestra en un tubo de 2 ml con columna miniprep y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto. Se cambió la columna a un nuevo tubo de 2 ml.

Se adicionaron 500 µl de buffer wash solution (AW1), se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto, se cambió la columna a un nuevo tubo de 2 ml. Se agregaron 500 µl de buffer wash solution (AW2), se centrifugó por 3 minutos, se descartó el pellet filtrado y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto. Se cambió la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml. Se adicionaron 150 µl de elution buffer (AE) o agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto. Se almacenó una alícuota de ADN a 4 °C y otra a -20 °C.

#### 4.4.3 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE COMPLETA

La extracción de ADN a partir de sangre completa se realizó con el Kit “Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep”, siguiendo el protocolo de extracción recomendado por el fabricante Axygen Scientific, Inc. (Central Avenue, Union City, CA, USA): A 200 µl de sangre completa se agregaron 200 µl de buffer Viral lysis (V-L), se mezcló invirtiendo el tubo y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 75 µl de buffer Protein precipitation buffer (V-N), se mezcló con vortex por 30 segundos y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se separó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 2 ml. Se adicionaron 250 µl de la mezcla Isopropanol + 1% de Ácido Acético, se pipeteó para homogenizar la mezcla, se transfirió todo el líquido a una columna Miniprep y se centrifugó a 6 000 rpm por 1



minuto. Se adicionaron 500 µl de buffer Wash buffer (W1A), se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 12 000 rpm por 1 minuto. Se desechó el líquido filtrado, se adicionaron 800 µl de buffer Desalting buffer (W2) a la comuna Miniprep y se centrifugó a 12 000 rpm por 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado y se centrifugó 1 minuto más para evitar que se queden residuos de buffer, se añadió 60 µl de buffer Tris-EDTA (TE) a la columna Miniprep para eluir el ADN, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 12 000 rpm por 1 minuto. Se almacenó el ADN a -20 °C.

## **4.5 IDENTIFICACIÓN DE *P. falciparum***

### **4.5.1 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIE *P. falciparum* POR MICROSCOPIA**

Se confirmó por microscopía que las muestras correspondían a *Plasmodium falciparum*. Se usó sangre reportada como positiva para realizar gota gruesa y frotis sanguíneo en portaobjetos. Se fijó el frotis en metanol al 100 %, sin fijar la gota gruesa. Se procedió a teñir la placa con una solución de GIEMSA al 15 % por 20 minutos y se observó en un microscopio óptico con una magnificación de 100 X.

### **4.5.2 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE *P. falciparum* POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

La especie fue determinada por PCR anidada y por PCR en tiempo real. Todos los procedimientos fueron realizados con el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler, en el caso de la PCR anidada y en el caso de la PCR en tiempo real se usó el equipo Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Standard Curve Experiments.

#### 4.5.2.1 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE *P. falciparum* POR PCR ANIDADA.

La PCR anidada es una modificación de la PCR convencional en donde se realizan dos rondas de amplificación con distintos pares de primers, con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la detección. Primero se realiza la PCR 1 con primers que van a amplificar una zona más extensa. Luego se utiliza el producto de la PCR 1 como molde para una segunda PCR, que se realiza con primers que van a amplificar una zona específica (Genomick, 2009).

La PCR fue realizada en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler. La PCR inicial fue realizada con los primers forward y reverse PLU5 y PLU6 (Tabla 1) que identifican la presencia de *Plasmodium* y para la PCR anidada se usó primers específicos para cada especie de *Plasmodium*, los primers forward y reverse FAL1 y FAL2 (Tabla 1) para identificar *P. falciparum* (Snounou., 1996). La reacción se hizo en un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (10 µM), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 5 µl de ADN.

El perfil térmico de la PCR1 constó de una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, 25 ciclos de: 58 °C por 2 minutos de hibridación, 72 °C por 2 minutos de extensión, 94 °C por 1 minuto de denaturación; por último 58 °C por 2 minutos de hibridación final y 72 °C por 5 minutos de extensión final, la reacción se completó reduciendo la temperatura a 20°C. Para la PCR 2 el perfil de amplificación fue el mismo pero se realizaron 30 ciclos (Snounou., 1996).

#### 4.5.2.2 DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LA ESPECIE *P. falciparum* POR PCR-PET

La PCR-PET es una modificación de la PCR en tiempo real donde se usan fluoróforos de intercalación del ADN. Los primers se han modificado en su extremo 5' con la adición de un oligonucleótido de 17 bases que está marcado con un fluoróforo (HEX o FAM); en el caso de que no se produzca amplificación la cola forma un bucle que extingue la fluorescencia debido a la proximidad de las cuatro bases Guanina (G) (Lucchi, *et al.*, 2013). Este procedimiento fue realizado en el equipo Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System Standard Curve Experiments. La PCR-PET anidada es una técnica que detecta la especie *P. falciparum* con los primers Falcip forward y Falcip reverse (Tabla 1) que tienen como blanco el gen *Pfr364* (Lucchi, *et al.*, 2013). La reacción se hizo en un volumen total de 20 µl que contenía: 10 µl de TaqMan Enviromental Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, UK), 0,25 µl de cada primer (10 µM), 7,5 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 2 µl de ADN.

El perfil térmico de la PET-PCR anidada constó de una denaturación inicial a 95 °C por 15 minutos, 45 ciclos de: 95 °C por 15 segundos denaturación y 60 °C por 40 segundos de anillamiento (Lucchi, *et al.*, 1996).

#### 4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69

Los microsatélites son repeticiones de motivos de dos o más nucleótidos. Éstos son muy usados en laboratorios para el estudio de la estructura poblacional de los parásitos que causan la malaria ya que son abundantes en el genoma del parásito, son altamente polimórficos y co-dominantes (Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2013).

#### 4.6.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly-A, PfPK2, TA109 Y 2490 POR PCR SEMI-ANIDADA

Los microsatélites TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109 y 2490 fueron amplificados usando los primers que se encuentran descritos en la Tabla 2. La reacción se hizo en un volumen final de 15  $\mu$ l que contenía: 7,5  $\mu$ l de GoTaq Colorless Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 0,6  $\mu$ l de cada primer (10  $\mu$ M), 5,3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura y 1  $\mu$ l de ADN. (CDC, 2014; Anderson, *et al.* 1999; Abdallah, *et al.* 2014).

El perfil térmico de la PCR 1 constó de una denaturación inicial a 94 °C por 2 minutos, 25 ciclos de: 94 °C por 30 segundos de denaturación, 42 °C por 30 segundos de hibridación, 40 °C por 30 segundos de extensión, 65 °C por 40 segundos de extensión; por último 65 °C por 2 minutos de extensión final. La reacción se completó reduciendo la temperatura a 4 °C. Para la PCR 2 el perfil térmico constó de una denaturación inicial a 94 °C por dos minutos, 25 ciclos de: 94 °C por 20 segundos de denaturación, 45 °C por 20 segundos de extensión, 65 °C por 30 segundos de extensión; por último 65°C por 2 minutos de extensión final. La reacción se detuvo reduciendo la temperatura a 4 °C (CDC, 2014; Anderson, *et al.* 1999; Abdallah, *et al.* 2014)

Los productos amplificados fueron corridos mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%. En cada pocillo se cargaron 5  $\mu$ l de los productos amplificados más 2  $\mu$ l del colorante Blue/Orange 6X (Promega, Madison, WI, USA). Para analizar el peso molecular de las muestras se utilizó un marcador de peso con rango de 100 a 1 500 pares de bases (Promega, Madison, WI, USA). Los geles fueron corridos a 80 voltios por 4 horas, la tinción se realizó con SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Anexo 2). Finalmente los geles fueron

observados con un transiluminador digital BioDoc-It™ de luz ultra violeta (UVP inc.). Las imágenes obtenidas fueron recortadas y etiquetadas en el programa Adobe Photoshop CS3 versión 10.0 (desarrollado por Adobe Systems Incorporated, 2003).

#### 4.6.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES C2M34 Y C3M69

Para amplificar el microsatélite C2M34 se usaron los primers forward y reverse 313\_F\_FAM y 313\_R (Abdallah, *et al.* 2014) y para el microsatélite C3M69 se usaron primers forward y reverse 383\_F\_HEX y 383\_R (Abdallah, *et al.* 2014). La reacción se hizo en un volumen final de 15 µl que contenía: 7,5 µl de GoTaq Colorless Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 0,6 µl de cada primer (10 µM), 4,3 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 2 µl de ADN (CDC, 2014; Abdallah, *et al.* 2014). Las secuencias de los primers se encuentran descritas en la Tabla 2.

El perfil térmico de la PCR constó de una denaturación inicial a 94 °C por 2 minutos, 5 ciclos de: 94 °C por 30 segundos de denaturación, 50 °C por 30 segundos de extensión, 60°C por 30 segundos de extensión; 94 °C por 30 segundos de denaturación, 40 ciclos de: 45 °C por 30 segundos de extensión, 60 °C por 30 segundos de extensión; por último, la reacción se completó reduciendo la temperatura a 4 °C (CDC, 2014; Abdallah, *et al.* 2014).

La visualización de los resultados se realizó de la misma forma que en el numeral 4.6.1.

### 4.7 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE FRAGMENTOS DE LOS MICROSATÉLITES

Se determinaron los tamaños de los microsatélites TA1, Poly-α, PfpK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69 por electroforesis capilar, en el equipo Applied Biosystems 3130xl Genetic

Analyzer, este procedimiento se realizó en la República de Corea del Sur por la empresa Macrogen.

## **4.8 ANÁLISIS DE TAMAÑO DE FRAGMENTO DE MICROSATÉLITES**

### **4.8.1 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE ADN CON AYUDA DEL SOFTWARE Peak Scanner**

El software Peak Scanner se usó para analizar los fragmentos de ADN y separar la mezcla de fragmentos de acuerdo a sus tamaños. Además de identificar los tamaños, el software permite editar y analizar los resultados para crear un perfil que proporciona información del perfil genético de cada una de las muestras.

A cada una de las muestras se las identificó como “Sample”, en el caso de los controles como “Positive Control” o “Negative Control”; a todas las muestras se les asignó un tamaño de estándar, ladder, de (GS400HD) en el método de análisis se escogió “Sizing Default-PP” y se procedió analizar las muestras para determinar el tamaño de los picos, comparando con el control positivo (Applied Biosystems, 2006). El tamaño de los marcadores estudiados en la cepa control 3D7 se muestra en la Tabla 3.

## **4.9 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL**

### **4.9.1 SOFTWARE Arlequin**

El software Arlequin ver. 3.5.1.2 (Swiss Institute of Bioinformatics), es un paquete de integración de varios métodos básicos y avanzados que permite el análisis de datos de genética de poblaciones, así como el cálculo de los índices de diversidad genética estándar, la

estimación de las frecuencias de alelos, haplotipos y el análisis de la varianza molecular (AMOVA), modelo estadístico que detecta la diferenciación usando marcadores moleculares. El programa fue utilizado para determinar la diferenciación y diversidad de las poblaciones estudiadas.

Para cada locus, se proporcionó el tamaño del microsatélite, la diferencia en el número de repeticiones es lo que dio origen a los diferentes alelos (Laurent Excoffier, 2011). A las muestras se las comparó con aislados históricos de Perú (Griffing, *et al.* 2011) y con aislados procedentes de Colombia (Murillo, *et al.* 2015).

#### 4.9.2 SOFTWARE Network

El software Network ver. 4.6.1.3 (Fluxus Technology Ltd., 2012) se utilizó para construir redes de estructura de la población y mapas que demuestran la relación genética entre aislados. Se construyeron redes de estructura de la población con las muestras ecuatorianas, aislados históricos de Perú (Griffing, *et al.* 2011), y aislados procedentes de Colombia (Murillo, *et al.* 2015).

#### 4.9.3 SOFTWARE Structure

El software Structure 2.3.4 (Pritchard Lab, Stanford University) fue utilizado para asignar individuos a diferentes poblaciones, basado en métodos bayesianos para inferir el número más probable de poblaciones (K) (Pritchard, *et al.* 2010). Se sometieron a este programa las muestras ecuatorianas, los aislados históricos de Perú (Griffing, *et al.* 2011) y los aislados procedentes de Colombia (Murillo, *et al.* 2015).

El procedimiento para la estimación de K fue analizado con el software “*Structure Harvester*” (Pritchard, *et al.* 2010).

#### 4.9.4 SOFTWARE LIAN 3.5

El Software LIAN ver. 3.7 (Haubold & Hudson, 2000) se utilizó para determinar la diversidad genética existente entre las poblaciones estudiadas poniendo a prueba la hipótesis nula de la vinculación de equilibrio para multilocus que se caracteriza por la independencia estadística de los alelos de los loci. Este análisis se evaluó por medio de 10 000 interacciones para generar una distribución significativa (Haubold, 2006). Este programa mide el desequilibrio de ligamiento, asociación no aleatoria de alelos que se la determina mediante el índice de asociación estándar  $I_A^S$ .

#### 4.9.5 SOFTWARE DARwin 6.0.5

El software DARwin 6.0.5 (Windows <sup>MT</sup>) (Perrier, *et al.*, 2005) fue desarrollado para el análisis de diversidad y filogenética basándose en las disimilitudes evolutivas. Se usó para realizar el árbol del vecino más cercano. El número de permutaciones usado fue de 10 000 (Perrier, *et al.* 2005).

### 4.10 GENOTIPOS DE *Pfhrp2* y *Pfhrp3*

Se realizó la genotipificación de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* con el fin de determinar la presencia de los genes en las muestras del estudio. La genotipificación de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* se realizó únicamente en muestras confirmadas positivas por microscopía, PCR y PCR-PET. Todos los protocolos de amplificación fueron realizados en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler.



#### 4.10.1 PCR DEL GEN *Pfhrp2* DE *P. falciparum*

La amplificación del gen *Pfhrp2* se realizó por PCR anidada, usando los primers forward y reverse 2E12F1 y 2E12R1 (Abdallah, *et al.* 2014) en la PCR 1 y los primers forward y reverse 2E12F y 2E12R (Abdallah, *et al.* 2014) para la PCR 2 (Tabla 4).

La reacción se hizo en un volumen final de 20 µl que contenía: 10 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (15 µM), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 4 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 2 µl de ADN para la PCR 1. Para la PCR 2 se realizó el mismo procedimiento con la diferencia de que los productos de la PCR 1 fueron disueltos en 1:5 en todas las muestras y controles.

El perfil térmico de la PCR1 constó de una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de: 95 °C por 30 segundos de denaturación, 60 °C por 30 segundos de hibridación, 68 °C por 30 segundos de extensión; por último 68 °C por 5 minutos de extensión final. La reacción se detuvo reduciendo la temperatura a 4 °C. Para la PCR 2, el perfil de amplificación fue el mismo pero la temperatura de hibridación dentro de los 30 ciclos fue de 65 °C.

Los productos amplificados fueron corridos mediante electroforesis con el buffer de corrida TBE 1X (Anexo 2 y 3), en geles de agarosa al 2%. En cada pocillo se cargaron 5 µl y 10 µl de los productos amplificados. Para analizar el peso molecular de las muestras se utilizó un marcador de peso con rango de 100 a 1 500 pares de bases (Promega, Madison, WI, USA). La tinción se realizó con SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Finalmente los geles fueron observados con un transiluminador digital BioDoc-It™ de luz ultra violeta (UVP inc.). Las imágenes obtenidas fueron recortadas y etiquetadas en el programa Adobe Photoshop CS3

Versión 10.0 (desarrollado por Adobe Systems Incorporated, 2003). Este protocolo fue proporcionado por el CDC y se ha usado en estudios como el de Abdallah, *et al.* (2014).

#### 4.10.2 PCR DEL GEN *Pfhrp3* DE *P. falciparum*

La amplificación de *Pfhrp3* se realizó por PCR anidada, usando los primers forward y reverse 3E12F1 y 3E12R1 (Abdallah, *et al.*, 2014) en la PCR 1 y los primers forward y reverse 3E12F y 3E12R (Abdallah, *et al.*, 2014) para la PCR 2 (Tabla 4).

La reacción se hizo en un volumen final de 20 µl que contenía: 10 µl de GoTaq Green Mastermix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl de cada primer (15 µM), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega, Madison, WI, USA), 4 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura y 2 µl de ADN para la PCR 1. Para la PCR 2 se realizó el mismo procedimiento con la diferencia de que los productos de la PCR 1 fueron diluídos 1:5 en todas las muestras y controles.

El perfil térmico de la PCR1 constó de una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de: 95 °C por 30 segundos de denaturación, 59 °C por 30 segundos de anillamiento, 68 °C por 30 segundos de extensión; por último 68 °C por 5 minutos de extensión final, la reacción fue completada reduciendo la temperatura a 4 °C. Para la PCR 2, el perfil de amplificación fue el mismo pero la temperatura de anillamiento dentro de los 30 ciclos fue de 64 °C.

Los productos amplificados fueron corridos mediante electroforesis con el buffer de corrida TBE 1X (Anexo 2 y 3), en geles de agarosa al 2%, en cada pocillo se cargaron 5 µl y 10 µl de los productos amplificados. Para analizar el peso molecular de las muestras se utilizó un marcador de peso con rango de 100 a 1 500 pares de bases (Promega, Madison, WI, USA). La

tinción se realizó con SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), finalmente los geles fueron observados con un transiluminador digital BioDoc-It™ de luz ultra violeta (UVP inc.). Las imágenes obtenidas fueron recortadas y etiquetadas en el programa Adobe Photoshop CS3 Versión 10.0 (desarrollado por Adobe Systems Incorporated, 2003). Este protocolo fue proporcionado por el CDC y se ha usado en estudios como el de Abdallah, *et al.* 2014.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 MUESTRAS USADAS EN EL ESTUDIO

Las muestras que se usaron para este estudio pertenecen a la especie *P. falciparum*, los datos y los códigos usados para cada muestra se encuentran descritos en la Tabla 5. La nomenclatura usada para codificar fue “Pf” que proviene de *Plasmodium falciparum*, la especie a la que pertenecen las muestras. También se realizó un mapa con la procedencia de cada muestra (Fig. 4). Se obtuvieron 59 muestras en total para este estudio. La mayoría de muestras pertenecieron a la Provincia de Esmeraldas, Cantón Esmeraldas, Parroquia Vuelta Larga (N=21). El resto de muestras fueron de la Provincia de Esmeraldas, Cantón Esmeraldas, Parroquias Esmeraldas (N=6), Tachina (N=1), Simón Plata Torres (N=4), 5 de Agosto (N=1), Cantón San Lorenzo, Parroquias Alto Tambo (N=1), Ancón (N=2), Calderón (N=1), San Lorenzo (N=12), Tululbi (N=1), Urbina (N=1) y dos muestras que no reportaron la parroquia de origen; de la Provincia de Manabí, Cantón Jaramijó, Parroquia Jaramijó (N=1). En la Provincia de Orellana, se tomaron muestras en el Cantón Aguarico, Parroquia Nuevo Rocafuerte (N=1). En la Provincia de Sucumbíos, se tomó una muestra en el Cantón Cascales, la muestra no reportó parroquia; y del Cantón Lago Agrio, Parroquia El Eno (N=2). Las muestras fueron tomadas desde finales de enero del año 2013 hasta inicios de diciembre del 2014.

### 5.2 CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE *P. falciparum*

Para confirmar la presencia de ADN de *P. falciparum* en las muestras colectadas, se usaron dos métodos: PCR anidada y PCR-PET con ADN obtenido a partir de las muestras descritas en el numeral anterior. La PCR anidada se realizó en todas las muestras obtenidas, los

productos amplificados se corrieron en geles de agarosa y se obtuvo una banda de 200 pares de bases (pb), en la PCR 2, que identifica la presencia de *P. falciparum* (Fig. 5).

Con la PCR-PET se realizó la confirmación de la presencia del parásito en las muestras. Con los productos amplificados se midió la fluorescencia y se determinó el número de ciclos necesarios para cruzar el umbral (CT). En las muestras que presentaron valores de CT = 40.5 ó menores se consideró que no existía ADN de *P. falciparum* (Tabla 6). Las muestras Pf 001, Pf 002, Pf 005, Pf 029 y Pf 054 fueron excluidas del estudio porque no presentaron CTs iguales o menores a 40.5. Las demás muestras dieron como resultado curvas bien definidas y con valores menores a 40.5. El CT de las muestras se encontró entre 20 y 36, aproximadamente, las líneas que se observaron antes del ciclo 23 representan el ruido normal que presenta este método (Fig. 6A). En la Fig. 6B se puede observar un ejemplo de cómo se presentaron las curvas de las muestras, se observaron dos curvas porque todas las muestras se encontraban por duplicado. El control empezó a amplificar desde el ciclo 20 y cerca del ciclo 40 se estabilizó (Fig. 6C). El control negativo no amplificó (Fig. 6D).

Todas las muestras fueron confirmadas previamente por microscopía, a excepción de las muestras Pf 022, Pf 036 y Pf 042.

### **5.3 GENOTIPOS DE *Pfhrp2* y *Pfhrp3***

Para confirmar la presencia de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en las muestras se usó PCR anidada. Se obtuvo una banda de 200 pb, en la PCR2, que identifica la presencia de los genes (Fig. 7) (Tabla 7).

El porcentaje de muestras que presentaron el gen *Pfhrp2* en cada una de las localidades se encuentra descrito en la Tabla 8 y la representación gráfica en Fig. 8A. El porcentaje total de positividad de *Pfhrp2* fue de 88,13%. El porcentaje de muestras que presentaron el gen *Pfhrp3* en cada una de las localidades se encuentra descrito en la Tabla 8 y la representación gráfica en la Fig. 8B. El porcentaje total de presencia de *Pfhrp3* fue de 62,71%. El gen *Pfhrp2* presentó mayor presencia que *Pfhrp3*. El porcentaje de muestras que presentaron ambos genes en cada una de las localidades se encuentra descrito en la Tabla 9 y la representación gráfica se encuentra en la Fig. 8C. Varias de las muestras (61,01%) fueron reconfirmadas por el CDC, en Atlanta.

#### **5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109, 2490, C2M34 y C3M69**

Para determinar el tamaño aproximado de los microsatélites en las muestras, se usó el método de PCR anidada. Las muestras Pf 003 a Pf 040 fueron analizadas previamente por Sáenz, *et al.* (en prensa). Para determinar el tamaño exacto de los microsatélites de las muestras, se mandó a secuenciar en la compañía MacroGen, en la República de Corea del Sur. Los productos amplificados para el microsatélite TA1 tuvieron un solo tamaño, 171 pb, para Poly- $\alpha$  tuvieron tamaños que estaban en el rango de entre 149 a 182 bases, para PfPK2 las muestras estuvieron en un rango de entre 159 a 177 pb, para TA109 se obtuvo un solo tamaño, 159 pb, para 2490 las muestras tuvieron un tamaño de entre 72 a 84 pb, para C2M34 las muestras tuvieron un tamaño de entre 224 a 232 y para C3M69 las muestras tuvieron un tamaño de entre 122 a 140 pb (Tabla 3)(Fig. 9).

En este estudio se realizaron 708 reacciones de amplificación de 59 muestras usando 7 marcadores microsatélites. El control usado fue NF54, obteniendo los tamaños definitivos de los fragmentos de 706 reacciones (99,71%). Las muestras Pf 042 y Pf 043 no presentaron resultado para el marcador microsatélite C2M34. En la Fig. 10 se observa un ejemplo de lectura de la genotipificación de las muestras con cada uno de los marcadores microsatelitales.

## **5.5 ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES DE *P. falciparum* DE ECUADOR**

Con los resultados del tamaño de los microsatélites de las muestras ajustados, tomando como referencia el estudio de Anderson, *et al.* (2000b), se determinó la estructura poblacional del parásito *P. falciparum* con el uso de los programas Arlequin ver. 3.5.1.2, LIAN ver. 3.5 y DARwin ver. 6.0.5.

Mediante el análisis de 7 marcadores se determinó la diversidad y diferenciación genética presente en las poblaciones de *P. falciparum* de Ecuador. Se realizó la estructura genética de las muestras aisladas de tres grupos geográficos: Esmeraldas, San Lorenzo y Amazonia.

Se analizaron 59 muestras, las cuales fueron divididas en tres grupos geográficos: Cantón Esmeraldas (34 muestras), Cantón San Lorenzo (20 muestras) y Amazonia (5 muestras, agrupadas). Debido a que solo habían 5 muestras en la Amazonia, los análisis con los programas Arlequin, y LIAN se realizaron solo con las muestras pertenecientes a los grupos de Esmeraldas y San Lorenzo. Se analizaron 54 muestras, de las cuales 34 pertenecieron a Esmeraldas y 20 a San Lorenzo.

### 5.5.1 POLIMORFISMO Y HETEROCIGOSIDAD

En la localidad de Esmeraldas se encontraron cuatro loci polimórficos: Poly- $\alpha$ , 2490, C2M34 y C3M69, dos alelos por cada locus, todos tuvieron una heterocigosidad esperada de 0,061 (Tabla 10). En la localidad de San Lorenzo se observó que los marcadores Poly- $\alpha$ , PfpK2, 2490, C2M34 y C3M69 mostraron ser polimórficos. Los marcadores Poly- $\alpha$ , PfpK2 y C2M34 presentaron cuatro alelos, mientras que mostraron dos alelos los marcadores 2490 y C3M69. El marcador Poly- $\alpha$  mostró la mayor heterocigosidad esperada (0,696) (Tabla 11). La localidad de San Lorenzo presentó mayor cantidad de alelos promedio (2,571) (Tabla 11) que la localidad de Esmeraldas (1,571) (Tabla 10). Se observó mayor heterocigosidad en la localidad de San Lorenzo (0,356), con cinco alelos polimórficos: Poly- $\alpha$  (0,696), PfpK2 (0,684), 2490 (0,351), C2M34 (0,477) y C3M69 (0,281). Los marcadores TA1 y TA109 no mostraron heterocigosidad (Tabla 12).

### 5.5.2 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD)

El desequilibrio de ligamiento se midió con el índice de asociación ( $I^S_A$ ) de cada una de las localidades ecuatorianas. En Esmeraldas el  $I^S_A$  fue de 0,4297 y en San Lorenzo el  $I^S_A$  fue de 0,0884. Esto indica que el LD es alto en Esmeraldas, lo que significa que la tasa de recombinación es poco frecuente y existe endogamia significativa. Mientras que San Lorenzo presentó menor LD que Esmeraldas, lo que sugiere que pocas combinaciones de alelos se heredan juntas (Tabla 13).



### 5.5.3 ÍNDICES DE FIJACIÓN Y ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

Para medir la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones y la diferenciación genética entre ellas se usó como parámetro el índice de fijación. La diferenciación encontrada entre las dos localidades ecuatorianas (Esmeraldas y San Lorenzo) basada en la comparación de  $F_{st}$  (índice que mide la distancia genética) mostró ser alta (0,49159), existe distancia genética entre ambas localidades (Tabla 14).

Se realizó un AMOVA usando 7 loci polimórficos para revelar la estructura genética de *P. falciparum* en Ecuador. Los resultados mostraron que la variación genética entre las poblaciones (Esmeraldas y San Lorenzo) fue de 1,05% porque la población de Esmeraldas presenta poquísima variación genética, neutralizando la variabilidad genética existente en San Lorenzo, mientras que dentro de las poblaciones fue de 57,86%, esto se debe a la diferencia que existe dentro de la población de San Lorenzo (Tabla 15).

Los índices de fijación están relacionados con el valor porcentual de variación genética, el valor de  $F_{ST}$  (mide la reducción de la heterocigosidad) fue de 0,42143, representa la variación entre las poblaciones con respecto a la varianza total, este valor fue altamente significativo. El valor de  $F_{CT}$  fue de 0,01047 y representa la variación dentro de las poblaciones con respecto a la varianza total, no fue significativo (Tabla 15).

### 5.5.4 RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES

Con ayuda del programa Network se determinó la relación genética entre parásitos de diferentes localidades. Se agrupó a los individuos según la similitud de sus haplotipos, se

obtuvo una diferenciación entre la procedencia de las muestras en su disposición espacial en la red. Treinta y siete de las 59 muestras (32 de Esmeraldas, 4 de San Lorenzo y la muestra de Cascales) mostraron pertenecer a un mismo haplotipo que presentaba similitud en los 7 loci analizados, cercano a este grupo de muestras se encontraron 3 muestras (una de Esmeraldas, una de San Lorenzo y una de Jaramijó) que presentaron diferencia en un solo locus. Se evidenció la existencia de un grupo de 5 muestras, procedentes de San Lorenzo, que presentó diferencia de un locus con 5 muestras (2 de San Lorenzo, una de Esmeraldas y 2 de Lago Agrio). El resto de muestras (10) presentaron entre 2 ó 3 loci de diferencia con los grupos principales (Fig. 11).

Para el análisis del vecino más cercano se usó el programa DARwin ver. 6.0.5, para agrupar a los individuos en forma jerárquica y aglomerativa en base a promedios de similitud. La cercanía de dos individuos y el hecho de pertenecer a una misma rama indican un alto grado de similitud genética entre ellos.

Se generó un dendograma de *P. falciparum* en Ecuador que mostró la similitud que existe entre las diferentes muestras ecuatorianas, se pudo apreciar que un grupo de 36 muestras (32 muestras de Esmeraldas, 3 muestras de San Lorenzo y la muestra de Cascales) no presentaron diferenciación entre ellas pero fueron diferentes al resto de las muestras. Con la muestra Pf 043 (San Lorenzo) la diferenciación fue muy poca pero con las muestras Pf 050 (Aguarico) y el grupo de las muestras Pf 024, Pf 025 y Pf 031 (2 de San Lorenzo y una de Esmeraldas) se apreció gran diferenciación (Fig. 12).

### 5.5.5 ESTRUCTURA POBLACIONAL

La prueba de asignamiento de individuos a diferentes poblaciones, usando el programa Structure ver. 2.3.4, basado en métodos bayesianos (método de análisis de datos que ayuda a inferir la probabilidad de que una hipótesis sea cierta) (Bolstad, 2004), para inferir el número más probable de poblaciones (K) representado en la muestra total, mostró elevada estructura poblacional. Se observó que el patrón de división de las muestras en poblaciones mantuvo a la mayoría de muestras de Esmeraldas juntas, representando un haplotipo único.

El programa *Structure Harvester*, estableció el  $K = 3$  como el número más probable de poblaciones, estando el primer grupo compuesto por muestras provenientes de Esmeraldas, unas pocas muestras de San Lorenzo y la muestra de Cascales; se observó un segundo grupo con algunas muestras de San Lorenzo, Lago Agrio, Aguarico y la muestra Pf 031 (Esmeraldas); y el tercer grupo, más pequeño que los dos anteriores, con muestras de San Lorenzo y la muestra de Jaramijó (Fig. 13).

## 5.6 COMPARACIÓN ENTRE *P. falciparum* ECUATORIANOS Y *P. falciparum* DE PAÍSES VECINOS

El análisis que se realizó para comparar las poblaciones ecuatorianas con las poblaciones de los países vecinos a nivel genético permitió determinar similitudes o diferencias entre los *P. falciparum* de Ecuador y los países vecinos. En este estudio se comparó *P. falciparum* ecuatorianos con las poblaciones de *P. falciparum* peruanas (Griffing, *et al.*, 2011) y colombianas (Murillo, *et al.*, 2015).

### 5.6.1 COMPARACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES ECUATORIANAS Y LAS POBLACIONES PERUANAS

Se realizó la caracterización de las poblaciones peruanas, ya presentadas por Griffing, *et al.* (2011), con 7 marcadores microsatelitales, los mismos que se usaron en la caracterización de las poblaciones ecuatorianas. Usando el programa Arlequin ver. 3.5.1.2 se realizó la comparación entre las poblaciones ecuatorianas y peruanas.

Las muestras de Perú fueron analizadas por el programa Arlequin de dos formas: divididas por linajes clonales y divididas por localidades, y por los programas Network y Structure se las analizó por linajes clonales.

En el primer caso se analizaron 184 muestras en total, de las cuales 54 pertenecían a Ecuador y 130 muestras a 4 localidades de Perú (Caballococha (CC) – 39, Padre Cocha (PC) - 47, Amazonia del Oeste (WA) - 15 y Zarumilla (PP) – 32) (Fig. 14).

La heterocigosidad que se observó en todas las localidades peruanas fue mayor a la que se observó en Esmeraldas, mientras que las localidades peruanas CC (0,532) y PC (0,551) tuvieron heterocigosidad mayor que la se observó en San Lorenzo (Tabla 16).

Para medir la variación de las frecuencias alélicas entre las localidades y la diferenciación genética entre ellas se usó como parámetro el índice de fijación. La diferenciación encontrada entre las dos localidades ecuatorianas (Esmeraldas y San Lorenzo) y las localidades peruanas (CC, PC, PP y WA) estuvo basada en la comparación del índice de fijación ( $F_{st}$ ) que mostró que la localidad WA presentaba la mayor diferenciación con Esmeraldas (0,85969), mientras que la localidad PP (0,00167) no presentó diferenciación; la localidad PP presentó mayor

diferenciación con San Lorenzo (0,44596) y la localidad CP presentó menor diferenciación con San Lorenzo (0,13531) (Tabla 17).

Se realizó un AMOVA usando 7 loci polimórficos para revelar la estructura genética de *P. falciparum*. Los resultados mostraron que la variación genética entre las localidades (localidades ecuatorianas y localidades peruanas) fue nula, mientras que entre grupos (países) fue de 46,45%, y dentro de las localidades fue de 57,78%. El valor de  $F_{ST}$  fue de 0,42225. El valor de  $F_{SC}$  fue de 0,44569, que fue altamente significativo, y el valor  $F_{CT}$  fue de -0,04229 (es considerado como 0) (Tabla 15).

El número de alelos por cada locus indicó que, en general, todos los loci de las localidades peruanas tuvieron mayor cantidad de alelos por locus que lo que se observó en las localidades ecuatorianas (Tabla 18). De las cuatro localidades peruanas, PP y WA presentaron tres y cinco loci polimórficos, respectivamente, mientras que CC y PC presentaron siete loci polimórficos. (Tabla 19).

En la segunda forma de análisis se analizaron 184 muestras en total, de las cuales 54 pertenecían a Ecuador y 130 muestras a 5 linajes clonales, parásitos que son genéticamente idénticos para un conjunto de marcadores, pero potencialmente variables para los demás, de Perú (Linaje clonal A – 24 muestras, Linaje clonal B -18 muestras, Linaje clonal C – 26 muestras, Linaje clonal D – 28 muestras y Linaje clonal E – 34 muestras). La heterocigosidad que se observó en los linajes clonales peruanos fue menor a la que se observó en San Lorenzo, pero mayor a la que se observó en Esmeraldas (Tabla 12).

Para medir la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones y la diferenciación genética entre ellas se usó como parámetro el índice de fijación. La diferenciación encontrada

entre las dos poblaciones ecuatorianas (Esmeraldas y San Lorenzo) y los linajes clonales de Perú (A, B, C, D y E) basada en la comparación de  $F_{st}$ s mostró que el linaje clonal B es el que presenta mayor diferenciación con Esmeraldas (0,88305), mientras que el linaje clonal E (-0,00028) no presentó diferenciación. El linaje clonal que presentó mayor diferenciación con San Lorenzo fue el linaje clonal E (0,45835) y el que menor diferenciación presentó fue el linaje clonal A (0,22247) (Tabla 14).

Se realizó un AMOVA usando 7 loci polimórficos para revelar la estructura genética de *P. falciparum*. Los resultados mostraron que la variación genética entre las localidades (localidades ecuatorianas y los linajes clonales A, B, C, D y E de Perú) fue nula, mientras que entre grupos (países) fue de 56,06%, y dentro de las localidades fue de 49,72% (Tabla 15).

Los índices de fijación están relacionados con el valor porcentual de variación genética, el valor de  $F_{ST}$  fue de 0,50277, representa la variación entre las localidades con respecto a la varianza total, este valor fue no significativo. El valor de  $F_{SC}$  fue de 0,52997, representa la variación entre grupos con respecto a la varianza total, fue altamente significativo y el valor  $F_{CT}$  fue de -0,05860, representa la variación dentro de las localidades con respecto a la varianza total, fue no significativo (Tabla 15).

La Tabla 20 indica el número de alelos por cada locus. Se observó que existió mayor cantidad de alelos promedio en San Lorenzo (2,57) que en los linajes clonales de Perú, mientras que Esmeraldas presentó mayor cantidad de alelos promedio (1,57) que los linajes clonales B y E.

Con respecto al número de loci polimórficos se observó que las poblaciones de Esmeraldas, San Lorenzo y los linajes clonales A, C y D presentaron cuatro loci polimórficos, el linaje

clonal E presentó tres loci polimórficos y el linaje clonal B presentó dos loci polimórficos (Tabla 21).

Con ayuda del programa Network se determinó la relación genética entre localidades. Se agrupó a los individuos según la similitud de sus haplotipos y se obtuvo una diferenciación entre la procedencia de las muestras en su disposición espacial en la red. Se observó que la mayoría de las muestras de Ecuador se encontraban agrupadas. Treinta y siete muestras, procedentes, en su mayoría del cantón Esmeraldas, mostraron el mismo genotipo que casi todas las muestras del linaje clonal E. La muestra Pf 050, procedente de Aguarico, estaba más relacionada a los linajes clonales A y B. La muestra Pf 064, procedente del cantón San Lorenzo, presentó mayor similitud genética con el linaje clonal D, al igual que la muestra Pf 061. El resto de las muestras de San Lorenzo tuvieron mayor relación con el linaje clonal D (Fig. 15).

Al usar la prueba de asignamiento de individuos a diferentes poblaciones, usando el programa Structure ver. 2.3.4 y el programa *Structure Harvester* se determinó que  $K = 5$  era el número de poblaciones con mayor probabilidad. A las muestras ecuatorianas y peruanas (linajes clonales) se las agrupó por haplotipos. Se observó que el Grupo 1 contenía muestras del linaje clonal D, tres muestras de San Lorenzo y una muestra de Esmeraldas (Pf 031); el Grupo 2 estuvo conformado por dos muestras del linaje clonal E, una muestra de Esmeraldas (Pf 053), las muestras de Lago Agrio y la mayoría de muestras de San Lorenzo; el Grupo 3 contenía a las muestras del linaje clonal E, dos muestras de San Lorenzo, la muestra de Cascales y la mayoría de muestras de Esmeraldas. En el Grupo 4 se encontraban las muestras del linaje clonal C y el Grupo 5 contenía a las muestras del linaje clonal A y B y la muestra Pf 050 (Aguarico) (Fig. 16).

### 5.6.2 COMPARACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES ECUATORIANAS Y LA LOCALIDAD DE NARIÑO (COLOMBIA)

Se realizó la caracterización de las poblaciones vecinas con 7 marcadores microsatélites, los mismos que se usaron en la caracterización de las poblaciones ecuatorianas; usando el programa Arlequin ver. 3.5.1.2 se realizó la comparación entre las localidades ecuatorianas y la localidad colombiana de Nariño, publicados por Murillo, *et al.*, 2015.

Se analizaron 93 muestras en total, de las cuales 54 pertenecían a Ecuador y 39 muestras pertenecientes al departamento de Nariño, Colombia. La heterocigosidad que se observó en Nariño fue menor a la que se observó en San Lorenzo, pero mayor a la que se observó en Esmeraldas (Tabla 12).

Para medir la variación de las frecuencias alélicas entre las localidades y la diferenciación genética entre ellas se usó como parámetro el índice de fijación. La diferenciación encontrada entre las dos localidades ecuatorianas (Esmeraldas y San Lorenzo) y la localidad de Nariño está basada en la comparación de  $F_{st}$ , esto mostró que Nariño presentó mayor diferenciación con Esmeraldas (0,51839), mientras que la diferenciación con San Lorenzo fue baja (0,04018) (Tabla 14).

Se realizó un AMOVA usando 7 loci polimórficos para revelar la estructura genética de *P. falciparum*. Los resultados mostraron que la variación genética entre las localidades (localidades ecuatorianas y Nariño) fue de 2,82%, mientras que entre grupos (países) fue de 35,50%, y dentro de las localidades fue de 25,19%. El valor de  $F_{ST}$  fue de 0,38322, que representa la variación entre las localidades con respecto a la varianza total, este valor fue altamente significativo. El valor de  $F_{SC}$  fue de 0,36530, representa la variación entre grupos



con respecto a la varianza total, fue altamente significativo y el valor FCT fue de 0,02823, representa la variación dentro de las localidades con respecto a la varianza total, fue no significativo (Tabla 15).

La Tabla 20 indica el número de alelos por cada locus. Se observó que San Lorenzo y Nariño presentaron el mismo número de alelos promedio (2,57), mientras que Esmeraldas presentó menor cantidad de alelos promedio (1,57) que San Lorenzo y Nariño. En el número de loci polimórficos se observó que las localidades de Esmeraldas y San Lorenzo presentaron cuatro loci polimórficos y Nariño presentó seis loci polimórficos (Tabla 21).

Con ayuda del programa Network, se determinó la relación genética entre localidades. Se agrupó a los individuos según la similitud de sus haplotipos, se observó que existía mayor similitud entre las muestras de San Lorenzo y Nariño, que entre las muestras de Esmeraldas y Nariño. La mayoría de las muestras de Esmeraldas, cuatro muestras de San Lorenzo y Pf 055 (Cascales) tuvieron una configuración genética idéntica. Las muestras Pf 009 (Esmeraldas), Pf 042 (Jaramijó) y Pf 049 (San Lorenzo) presentaron gran similitud con el grupo más grande de muestras de Esmeraldas. Al igual que las muestras de San Lorenzo, las muestras de Nariño presentaron mayor variación genética por lo que se pudo observar varios grupos de haplotipos. Algunas muestras de San Lorenzo presentaron alta similitud genética, e incluso igualdad, con las muestras de Nariño. Las muestras de la Amazonia presentaron mayor similitud con las muestras de San Lorenzo (Fig. 17)

Al usar la prueba de asignamiento de individuos a diferentes poblaciones, usando el programa Structure ver. 2.3.4 y el programa *Structure Harvester* se determinó que  $K = 3$  era el número de poblaciones con mayor probabilidad. A las muestras ecuatorianas y colombianas se las

agrupó por haplotipos, se observó que el Grupo 1 estuvo conformado por la mayoría de las muestras de Esmeraldas (a excepción de Pf 031), por cinco muestras de San Lorenzo y la muestra de Cascales (Pf 055). El Grupo 2 contenía a las muestras Pf 031 (Esmeraldas), Pf 042 (Jaramijó), Pf 050 (Aguarico), Pf 061, Pf 062 (ambas de Lago Agrio), ocho muestras de San Lorenzo y nueve muestras de Nariño; el Grupo 3 contenía las muestras Pf 053 (Esmeraldas), siete muestras de San Lorenzo y la mayoría de muestras de Nariño (Fig. 18).

### 5.6.3 COMPARACIÓN ENTRE LAS POBLACIONES ECUATORIANAS, LINAJES CLONALES DE PERÚ (A, B, C, D Y E) Y POBLACIONES DE NARIÑO (COLOMBIA)

Se realizó la caracterización de las poblaciones vecinas con 7 marcadores microsatélites entre las localidades ecuatorianas, linajes clonales peruanos y la localidad colombiana de Nariño en conjunto. Se realizó el análisis de las muestras de los tres países en conjunto para determinar si es que existía diferencia entre los resultados que se obtuvieron al analizar las muestras por separado.

Las muestras de Ecuador, Perú y Colombia fueron analizadas por el programa Arlequin. Se analizaron 223 muestras en total, de las cuales 54 muestras pertenecían a Ecuador, 130 muestras a 5 linajes clonales de Perú (Linaje clonal A – 24 muestras, Linaje clonal B -18, Linaje clonal C – 26 muestras, Linaje clonal D – 28 muestras y Linaje clonal E – 34), y 39 muestras pertenecían al departamento de Nariño (Colombia).

Se realizó un AMOVA usando 7 loci polimórficos para revelar la estructura genética de *P. falciparum*. Los resultados mostraron que la variación genética entre las localidades (localidades ecuatorianas, linajes clonales de Perú y localidad de Nariño) fue nula, mientras que entre grupos (países) fue de 45,93%, y dentro de las localidades fue de 55,08% (Tabla 15).

El valor de FST fue de 0,44915, que representa la variación entre las localidades con respecto a la varianza total, este valor fue no significativo. El valor de FSC fue de 0,45468, representa la variación entre grupos con respecto a la varianza total, fue altamente significativo, y el valor FCT fue de -0,01014, representa la variación dentro de las localidades con respecto a la varianza total, fue no significativo (Tabla 15).

La Tabla 20 indica el número de alelos por cada locus, lo que se observó es que existe mayor cantidad de alelos promedio en San Lorenzo y Nariño (2,57) que en el Esmeraldas y los linajes clonales de Perú. El linaje clonal E de Perú presentó la menor cantidad de alelos por locus (1,43); el número total de alelos promedio de todas las localidades fue de 8.

La Tabla 21 muestra el número de loci polimórficos, se observó que la localidad de Nariño presentó seis loci polimórficos, las localidades de Esmeraldas, San Lorenzo y los linajes clonales A, C y D presentaron cuatro loci polimórficos. El linaje clonal E presentó tres loci polimórficos y el linaje clonal B presentó dos loci polimórficos, en promedio de todas las localidades el número de loci polimórficos fue de 3,88.

Con ayuda del programa Network se determinó la relación genética entre localidades. Se agrupó a los individuos según la similitud de sus haplotipos, se observó que la mayoría de las muestras ecuatorianas, procedentes de Esmeraldas, en su mayoría, tuvieron una configuración genética similar o idéntica al linaje clonal E, algunas muestras de San Lorenzo y la muestra de Cascales se encontraban en este grupo, hubieron algunas muestras de Nariño que estuvieron relacionadas a este grupo. La mayoría de las muestras de San Lorenzo estaban relacionadas con algunas muestras de Nariño. Se observó que la mayoría de las muestras de Nariño presentaban

mayor similitud con las muestras ecuatorianas, a excepción de dos muestras que eran más similares a los linajes clonales D y C (Fig. 19).

Al usar la prueba de asignamiento de individuos a diferentes poblaciones, usando el programa Structure ver. 2.3.4 y el programa *Structure Harvester* se determinó que  $K = 6$  era el número de poblaciones con mayor probabilidad (Fig. 20A). A las muestras ecuatorianas, linajes clonales peruanos (A, B, C, D y E) y muestras colombianas se las agrupó por haplotipos. Se observó que el Grupo 1 estuvo conformado por las siete muestras de San Lorenzo, Pf 053 (Esmeraldas) y la mayoría de muestras de Nariño; el Grupo 2 contenía al linaje clonal C de Perú; el Grupo 3 estuvo conformado por las muestras Lago Agrio, pocas muestras de San Lorenzo, Pf 050 (Aguarico), las muestras del linaje clonal D, dos muestras del linaje clonal E y nueve muestras de Nariño; el Grupo 4 contenía a los linajes clonales A y B; el Grupo 5 estaba conformado por casi todas las muestras de Esmeraldas (exceptuando Pf 031 y Pf 053) pocas muestras de San Lorenzo, Pf 042 (Jaramijó) y la mayoría de las muestras del linaje clonal E. El Grupo 6 estaba conformado por Pf 031 (Esmeraldas), tres muestras de San Lorenzo y la mayoría de las muestras del linaje clonal D (Fig. 20B).

Se determinó la estructura poblacional en las localidades de los tres países (Esmeraldas y San Lorenzo de Ecuador, Caballococha, Padre Cocha, Ullpayacu, Pampa Hermosa y Zarumilla de Perú y Nariño de Colombia) utilizando el programa Structure ver. 2.3.4. Cada una de las poblaciones establecidas por el programa Structure fue representada por colores, en el mapa (Fig 20C) se mostró la proporción que representaba cada una de estas poblaciones en las diferentes localidades de procedencia de las muestras.

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 6.1 MUESTRAS USADAS EN EL ESTUDIO

*P. falciparum* es la especie causante de malaria que presenta mayor prevalencia en África y es la especie responsable de la mayoría de muertes por esta enfermedad. La distribución de esta especie no es tan amplia como la de la especie *Plasmodium vivax*, ya que *P. vivax* se puede adaptar a temperaturas más bajas que *P. falciparum* (WHO, 2014).

*P. falciparum* causa la mayor tasa de mortalidad y morbilidad de malaria en el mundo (Rowe, *et al.* 2009). En nuestro país se puede encontrar la enfermedad en la Costa y la Amazonia (Sáenz, *et al.*, en prensa); y Ecuador se encuentra en etapa de pre-eliminación (WHO, 2014). La Provincia de Esmeraldas históricamente ha presentado gran número de casos de malaria, principalmente causada por *P. falciparum* (Valenzuela, 2013) y es la única provincia del país que presenta regularmente casos de malaria causada por esta especie. La mayor parte de muestras (54) que se usaron en este estudio procedieron de la Provincia de Esmeraldas, específicamente del Cantón Esmeraldas (34) y del Cantón San Lorenzo (20).

### 6.2 CONFIRMACIÓN DE LA ESPECIE *Plasmodium falciparum*

El estudio de Snounou (1996) describió la PCR anidada como un método molecular sensible para determinar la presencia de *P. falciparum* en las muestras de sangre, mediante la amplificación del gen *18S* de la subunidad ribosomal pequeña de ARN. Las muestras Pf 001, Pf 002, Pf 005, Pf 029 y Pf 054 no presentaron la banda lo que indicó que no existía ADN del parásito o éste se degradó por causas externas.

Otro método molecular de detección usado fue la PCR-PET. En esta técnica molecular, las muestras positivas para *P. falciparum* presentaron CTs menores a 40.5 por lo que se confirmó la presencia del parásito en las muestras (Lucchi, *et al.* 2013), ya que a mayor densidad parasitaria presente en la muestra el valor de CT es menor (Lucchi, *et al.* 2014).

Al comparar los dos métodos de detección molecular del parásito, PCR anidada (Snounou, 1996) y PCR-PET (Lucchi, *et al.*, 2013), se determinó que la PCR anidada es más sensible que la PCR-PET, porque la PCR anidada consta de una doble amplificación del material genético, haciendo que se puedan detectar parasitemias pequeñas que la PCR-PET no puede detectar. Los resultados observados demostraron que la PCR anidada fue igual de eficiente que PCR-PET. Además, se realizó la confirmación de la presencia de *P. falciparum* en las muestras analizadas en este estudio mediante microscopía.

### **6.3 GENOTIPOS DE *Pfhrp2* y *Pfhrp3***

La proteína HRP2 es blanco de la mayoría de las RDTs del mundo que detectan *P. falciparum* y la proteína HRP3 tiene una estructura similar a HRP2 (Baker, *et al.* 2010). En este estudio buscamos determinar el porcentaje de muestras que presentan los genes que codifican para estas proteínas, en las poblaciones ecuatorianas para poder establecer la confiabilidad de diagnóstico de las RDTs. Es importante realizar el análisis de HRP2 para determinar si el uso de RDTs es factible en las poblaciones ecuatorianas y es importante el análisis de HRP3 ya que esta proteína presenta reactividad cruzada con HRP2, lo que puede influenciar en los resultados de las RDTs.

Todas las muestras fueron sometidas a la técnica de PCR anidada para comprobar la presencia del gen *Pfhrp2* de *P. falciparum*, la banda aproximada que se observó en las muestras fue de

200 pb; la variación que se apreció se debe a que el gen puede tener una variación en su tamaño de 27 ó 18 pb dependiendo de la procedencia de la muestra (Baker, *et al.*, 2010). En Ecuador se ha reportado un solo tipo de secuencia en el parásito Ecu1110, en los estudios realizados por Baker, *et al.* (2005) y Baker, *et al.* (2010). El presente estudio mostró que 11,87% (7/59) de las muestras no presentaron el gen. En Esmeraldas el 6% de las muestras presentaron delección de *Pfhrp2*, el 15% de las muestras de San Lorenzo presentaron delección del gen y en la Amazonia se presentó mayor porcentaje de delección de *Pfhrp2* (40%); sin embargo, en la Amazonia la cantidad de muestras analizadas fue muy pequeña para poder establecer una adecuada comparación con las otras localidades.

Los resultados de este estudio sugieren que el uso de RDTs en estas localidades no resulta 100% efectivo y podría generar falsos negativos lo que agrega dificultad al objetivo de eliminar la malaria en el país. La delección del gen en las muestras ecuatorianas confirma lo que se ha observado en otros países como Perú, Honduras y Colombia (Akinyi, *et al.*, 2013; Gamboa, *et al.*, 2010; Murillo, *et al.*, 2015; Baker, *et al.*, 2010; Baldeviano, *et al.*, 2015). Tanto en Colombia (Murillo, *et al.*, 2015) como en Perú (Baldeviano, *et al.*, 2015) la proporción de muestras que presentan delección de *Pfhrp2* fue mayor en la Amazonia que en otras zonas estudiadas. Existen estudios que demostraron que la ausencia del gen *Pfhrp2* es producto de la delección de un segmento del cromosoma 8. La delección del gen *Pfhrp2* o alteración de la secuencia produce falsos negativos en las RDTs que tiene como blanco los antígenos de la proteína HRP2 (Akinyi, *et al.*, 2013; Gamboa, *et al.*, 2010; Murillo, *et al.*, 2015; Baker, *et al.*, 2010; Baldeviano, *et al.*, 2015). El porcentaje de delección de *Pfhrp2* es menor en Ecuador (11,87%) que en Colombia (18%) (Murillo, *et al.*, 2015) y que en Perú (41%) (Gamboa, *et al.*, 2010), lo que está asociado, posiblemente, a la diversidad genética

existente en cada uno de los países o con el hecho de que en Ecuador se analizaron pocas muestras de la Amazonia.

Todas las muestras fueron sometidas a la técnica de PCR anidada para comprobar la presencia del gen *Pfhrp3* de *P. falciparum*. La banda aproximada que se observó en las muestras fue de 200 pb; la variación que se apreció se debe a que el gen puede tener una variación en su tamaño de 18 ó 15 pb dependiendo de la procedencia de la muestra (Baker, *et al.* 2010). El presente estudio mostró que 34,29% (22/59) de las muestras presentaron la delección del gen *Pfhrp3*. En Esmeraldas el 21% de las muestras presentaron la delección de *Pfhrp3*, el 55% de las muestras de San Lorenzo presentaron la delección de *Pfhrp3* y en la Amazonia el 80% de las muestras presentaron la delección del gen. Sin embargo, el número de muestras de la Amazonia es muy reducido para establecer una verdadera comparación con las otras localidades. Estudios de países de América del Sur han reportado delección de *Pfhrp3* por la delección de un segmento subtelómico del cromosoma 13 del parásito *P. falciparum* (Gamboa, *et al.*, 2010; Baker, *et al.*, 2010; Abdallah, *et al.*, 2015; Murillo, *et al.*, 2015). En los países vecinos de Colombia (Murillo, *et al.*, 2015) y Perú (Gamboa, *et al.*, 2010) se observa que la Amazonia presenta mayor prevalencia de delección del gen *Pfhrp3* que en otras zonas de estudio. El porcentaje de delección de *Pfhrp3* es menor en Ecuador (34,29%) que en Colombia (41,33%) (Murillo, *et al.* 2015) y que en Perú (70%) (Gamboa, *et al.*, 2010), lo que está asociado, posiblemente, a la diversidad genética existente en cada uno de los países. Como las muestras analizadas son mayoritariamente de la Costa ecuatoriana, se observó que San Lorenzo presentó mayor delección de los genes, lo que está relacionado a la mayor diversidad existente en esta localidad.



Los resultados de este estudio confirman que la delección de uno de los genes (*Pfhrp2* o *Pfhrp3*) o de ambos genes puede realizarse de forma natural y no solo en cepas de laboratorio que hayan sido mantenidas por largo tiempo y que la frecuencia de las delecciones es alta en América del Sur (Baker, *et al.*, 2010; Baldeviano, *et al.*, 2015; Gamboa, *et al.*, 2010; Abdallah, *et al.*, 2015; Murillo, *et al.*, 2015). Además, el porcentaje de delección del gen *Pfhrp2* fue menor al porcentaje de delección del gen *Pfhrp3* en las muestras de este estudio, esto puede estar relacionado al lugar que ocupa cada uno de los genes (*Pfhrp2* y *Pfhrp3*) dentro del cromosoma 8 y 13, respectivamente.

Los parásitos que presentan delección de uno o de ambos genes representan un problema para la eliminación de la enfermedad del país, porque al someter las muestras a RDTs pueden generar falsos negativos por la ausencia del blanco (HRP2), por ello los resultados deben ser siempre confirmados por otras técnicas de diagnóstico, como microscopía.

#### **6.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DE *Plasmodium falciparum* ECUATORIANAS**

Los microsatélites son marcadores moleculares que son repeticiones de motivos de dos a ocho nucleótidos y son generados por un evento de deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2013). En este estudio se usaron estos marcadores para caracterizar molecularmente a las poblaciones ecuatorianas y determinar la estructura de las poblaciones del país, para aportar a la eliminación de la malaria de Ecuador.

Los estudios de Anderson, *et al.* (1999) y Anderson, *et al.* (2000b) caracterizaron varios microsatélites de *P. falciparum*, de los cuales cinco marcadores microsatélites (TA1, Poly- $\alpha$ , PfPK2, TA109, 2490) se usaron en el presente estudio. Además, el estudio de Abdallah, *et al.*

(2015) caracterizó dos marcadores microsatélites (C2M34 y C3M69) de *P. falciparum* que también fueron usados en este estudio. Estos microsatélites presentaron variación en su tamaño, lo que se debe al diferente número de repeticiones del motivo. Estudios reportados en Honduras (Abdallah, *et al.*, 2015), Venezuela (Chenet, *et al.*, 2012), Perú (Griffing, *et al.*, 2011; Baldeviano, *et al.*, 2015) y Ecuador (Sáenz, *et al.*, en prensa) confirman la variación en tamaño que se observó en los resultados obtenidos en este estudio.

La lectura de los espectroferogramas mostró que las muestras eran monoclonales, ya que todas las muestras mostraron solo un pico (Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2013b). Al conjunto de datos analizados por cada muestra se lo denominó haplotipo, combinación única de alelos de loci analizados (Orjuela-Sánchez, *et al.*, 2013b). Las muestras Pf 042 y Pf 043 no mostraron resultado en el locus C2M34 lo que puede deberse a la falta de ADN en las muestras, muy poca cantidad del mismo o a que por algún factor externo los primers usados para la amplificación del gen de interés no hayan presentado complementariedad con el templado.

Se dividió a las muestras del estudio en 3 grupos (Esmeraldas, San Lorenzo y Amazonia) tomando en cuenta su procedencia geográfica. La mayoría de análisis se realizaron con las muestras de Esmeraldas y San Lorenzo porque el tercer grupo (Amazonia) presentaba pocas muestras para poder ser analizadas, este último grupo estuvo conformado por muestras pertenecientes a más de una provincia.

#### 6.4.1 POLIMORFISMO Y HETEROCIGOSIDAD

El polimorfismo genético es la variación genética que se observa en las poblaciones, es la existencia de múltiples alelos en un locus determinado (Passarge, 2010). La heterocigosidad se define como el número de individuos que presentan dos alelos diferentes en un locus

(Campbell & Reece, 2007). En este estudio, se determinó el polimorfismo y la heterocigosidad para determinar la diversidad genética de las poblaciones ecuatorianas.

La localidad de San Lorenzo presentó mayor heterocigosidad esperada (0,356) que Esmeraldas (0,035), ésto estuvo relacionado al hecho de que la mayoría de las muestras que se hallaban en el grupo de Esmeraldas procedían de un brote clonal de *P. falciparum* que se produjo en la parte sur de la ciudad de Esmeraldas, en el año 2013 (Sáenz, *et al.*, en prensa). Otra explicación, de la gran diferencia en la heterocigosidad esperada, es la ubicación geográfica del Cantón San Lorenzo, en la frontera norte del país, ya que en esta zona existe migración constante entre Ecuador y Colombia. Los resultados de heterocigosidad obtenidos en Ecuador son muy bajos comparados con otras localidades, como las Islas Solomón (0,54)(Gray, *et al.*, 2013), Yemen (0,88)(Al-Hamidhi, *et al.*, 2013), Papúa Nueva Guinea (0,77) (Jennison, *et al.*, 2015). Sin embargo, San Lorenzo presentó heterocigosidad un poco mayor a Colombia (0,27) (Echeverry, *et al.*, 2013), confirmando que en los países de América del Sur existe poca diversidad genética.

Tomando en cuenta cada uno de los loci analizados se observó que tanto TA1 y TA109 presentaron un solo alelo en ambas poblaciones y heterocigosidad igual a cero, en otros estudios se observó valores superiores en la heterocigosidad lo que depende del número de alelos existente en cada locus (Chenet, *et al.*, 2012; Ferreira, *et al.*, 2002). En Esmeraldas, además de TA1 y TA109, se encontró que PfPK2 no presentó heterocigosidad, poseía un solo alelo; en San Lorenzo únicamente los loci TA1 y TA109 presentaron un alelo único, heterocigosidad esperada igual a cero. Ésto ocurre porque, a pesar de que en San Lorenzo existe mayor diversidad genética que en Esmeraldas, esta localidad presenta baja diversidad como otras zonas de América del Sur (Anderson, *et al.*, 2000). Mientras mayor sea la

heterocigosidad que presente un locus existe mayor diversidad genética en él (Abdallah, *et al.*, 2015).

#### 6.4.2 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD)

El desequilibrio de ligamiento (LD) es la asociación no aleatoria de alelos que se determina mediante el índice de asociación estándar ( $I^S_A$ ) (Oliva, *et al.*, 2004). Mientras más cercano a 1 es el índice, la tasa de recombinación es menos frecuente y existe mayor endogamia. En este estudio se midió el LD mediante  $I^S_A$  en las localidades ecuatorianas de Esmeraldas y San Lorenzo.

En una zona de baja transmisión existe poca recombinación, baja diversidad y alto LD (Anderson, *et al.*, 2000b). Nuestros resultados indicaron que el desequilibrio de ligamiento (LD) en las localidades de Esmeraldas y San Lorenzo fue de 0,4297 y 0,0884, respectivamente. Los parásitos de la localidad de Esmeraldas fueron más homogéneos que los de la localidad de San Lorenzo, ésto significa que en la población de Esmeraldas existe mayor probabilidad de que los genes no se segreguen independientemente y tiendan a heredarse juntos, lo que podría estar relacionado a la clonalidad de las poblaciones de *P. falciparum* que se evidencia en América del Sur, a la baja transmisión y al establecimiento reciente de parásitos de haplotipos distintos que reduce las posibilidades de recombinación entre parásitos (McCollum, *et al.*, 2014), además de la baja diversidad existente en la localidad. En San Lorenzo existió mayor cantidad de recombinación por lo que mayor cantidad de genes no tienden a heredarse juntos, sino independientemente, por la presencia de mayor diversidad en la localidad y pool genético más grande (McCollum, *et al.*, 2014). En países como Papúa Nueva Guinea se observa que existe mayor diversidad por lo el LD fue 0,0088 (Jennison, *et*

*al.*, 2015). En Colombia fue de 0,16 (Echeverry, *et al.*, 2013), un poco menos diverso que San Lorenzo. Perú presentó mayor LD (0,23) (Griffing, *et al.*, 2011) que San Lorenzo pero mayor LD que Esmeraldas. Esto demuestra que tanto los países vecinos como Ecuador presentan baja diversidad lo que hace que el LD sea mayor, confirmando lo que se observa en países de América del Sur (Anderson, *et al.*, 2000b).

#### 6.4.3 ÍNDICE DE FIJACIÓN Y AMOVA

El estadístico de fijación  $F_{st}$ , también conocido como “Distancia de Nei”, refleja la distancia (diferenciación genética) existente entre dos poblaciones (De Salle, *et al.*, 2002). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) es una herramienta molecular, que se usa para la estimación de la estructura genética a partir de la información contenida en las frecuencias alélicas con índices de fijación que permiten comparar de manera clara y cuantitativa la diferenciación existente entre las poblaciones estudiadas (Díaz, 2009). Tanto el estadístico  $F_{st}$  como el AMOVA fueron usados en este estudio para determinar la diferenciación entre las localidades analizadas.

El estadístico  $F_{st}$  establece la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones, y por tanto la diferenciación genética entre ellas (Wright, 1951). El  $F_{st}$  es un parámetro que nos da una idea de la historia de las poblaciones estudiadas, dando información acerca de la importancia evolutiva, del flujo génico y la deriva génica. La diferencia encontrada entre Esmeraldas y San Lorenzo fue alta (0,49159) porque existen varios alelos que no se comparten entre las dos localidades.

El índice de asociación  $F_{ST}$ , también conocido como “coeficiente de endogamia” (Díaz, 2009), mide el grado de diferenciación entre subpoblaciones. Los índices de asociación  $F_{SC}$  y

FCT, miden la diferenciación de la heterocigosidad promedio en toda la población en general y la diferenciación dentro de la población, respectivamente (Nei, 1973). Las poblaciones de *P. falciparum* en Ecuador mostraron un porcentaje de variación de 1,05% con un valor de  $F_{ST} = 0,42143$ , valor altamente significativo, lo que indica que existe diferenciación genética entre la localidad de Esmeraldas y la localidad de San Lorenzo, a nivel estadístico. Estos resultados confirman los resultados obtenidos al analizar el polimorfismo de las localidades ecuatorianas. Dentro de las localidades el porcentaje de variación fue de 57,86%, con un  $F_{CT} = 0,01047$ , valor no significativo, no existe diferenciación genética dentro de las localidades. A nivel estadístico, los miembros de la localidad de Esmeraldas no presentan alta diversidad genética, son casi idénticos, mientras que los miembros de la localidad de San Lorenzo, a pesar de mostrar mayor variación genética que Esmeraldas, no presentan el nivel de variación que se observa en el continente africano o asiático (Anderson, *et al.*, 2000). El porcentaje de variación genética de *P. falciparum* en Ecuador se debe a diferencias entre haplotipos dentro de las localidades (Karunaweera, *et al.*, 2008).

#### 6.4.4 RELACIÓN GENÉTICA ENTRE LOCALIDADES

Para estudiar la relación genética entre las localidades de *P. falciparum* de Ecuador realizamos una red de nexos; con el programa Network. El programa agrupó a los haplotipos por la similitud existente entre ellos, mostró la relación genética entre las muestras de las diferentes localidades (Griffing, *et al.*, 2011). Se observó un grupo grande, donde la mayoría de muestras pertenecían a la localidad de Esmeraldas, que fueron genéticamente idénticas, confirmando lo encontrado por Sáenz, *et al.* (en prensa), donde casi todas las muestras presentaron el mismo haplotipo, apoyando la hipótesis de que presentan un único ancestro común, mientras que las muestras del Cantón San Lorenzo mostraron mayor diferenciación entre ellas, lo que podría

deberse a la continua entrada de parásitos por migración entre países o a la generación de mutaciones (Fig. 19); mientras que las muestras de la Amazonia eran muy diferentes entre sí debido al bajo número de muestras y a la diversidad del origen de las muestras.

El análisis del vecino más cercano permite definir la relación entre individuos agrupándolos en forma aglomerativa y jerárquica en base a promedios de similitud (Ferreira, *et al.*, 2002). En este estudio se realizó este análisis para determinar la cercanía de los individuos construyendo un árbol que cumplía el principio de máxima parsimonia.

El árbol del vecino más cercano que se generó con el programa DARwin, ayudó a visualizar la distancia que existe entre las muestras a nivel genético, el hecho de estar al mismo nivel significa que las muestras son muy parecidas o idénticas. Mientras mayor distancia vertical existió entre las muestras mayor diferencia genética entre ellas existió (Mitchell, 2005).

Estudios en otros sitios han demostrado que la diversidad de las poblaciones de *P. falciparum* está relacionada con la procedencia de las muestras, existe mayor diversidad en África, en Asia es intermedia y en América del Sur es baja (Anderson, *et al.*, 2000). Mientras mayor diversidad exista en la zona estudiada el dendograma es más grande, presenta mayor cantidad de ramas y las ramas tendrán varias longitudes (Saitou & Nei, 1987). En las muestras de Ecuador se aprecia poca diversidad, ésto puede deberse a la evidente clonalidad de su población y la baja tasa de transmisión. Esto se ve no solo en Ecuador, sino en toda América del Sur (Anderson, *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos con este análisis confirman lo observado con el programa Network.

#### 6.4.5 ESTRUCTURA POBLACIONAL

Conocer la estructura de la población de *P. falciparum* permite observar el grado de relación que presentan los individuos entre ellos y entre las diferentes localidades estudiadas, se asignan a los parásitos a diferentes poblaciones, según el grado de relación que presenten (Cañón, *et al.*, 2006). En este estudio se realizó el análisis de la estructura poblacional en las muestras ecuatorianas para determinar cuántas poblaciones existen en estas zonas y a qué poblaciones pertenecen las muestras estudiadas.

El número de poblaciones fue 3, donde la mayoría de las muestras de Esmeraldas fueron asignadas a una sola población, esto está relacionado a la clonalidad de las muestras, junto con las muestras de Cascales y 4 muestras de San Lorenzo. Una hipótesis alternativa es que estos parásitos descendieron de un parásito ancestral que pudo haber en la Costa ecuatoriana en la década de 1990 (Sáenz, *et al.*, en prensa). La mayoría de las muestras de San Lorenzo fueron clasificadas en otro grupo junto con una muestra de Esmeraldas y todas las muestras de la Amazonia. La similitud que se presentó en las muestras podría también estar relacionada con la presencia de casos importados de la localidad de Esmeraldas y Nariño, además de la posible presencia de casos asintomáticos que actúan como reservorio de la enfermedad. En el tercer grupo, se presentaron pocas muestras de San Lorenzo y la muestra de Jaramijó, la cual fue importada de la provincia de Esmeraldas (información proporcionada por SNEM), apoyando la hipótesis migración de parásitos con personas dentro del país.



## 6.5 COMPARACIÓN ENTRE *P. falciparum* ECUATORIANOS Y *P. falciparum* DE PAÍSES VECINOS

El análisis comparativo entre *P. falciparum* ecuatorianos estudiados por Sáenz, *et al.* (en prensa), *P. falciparum* peruanos estudiados por Griffing, *et al.* (2011), *P. falciparum* de Nariño-Colombia, estudiado por Murillo, *et al.* (2015), y por este estudio se llevó a cabo considerando los tamaños de fragmentos obtenidos con los mismos siete marcadores microsatelitales. Las muestras de Perú fueron analizadas de dos formas: por linajes clonales y por localidades, ésto se hizo para poder comparar de forma más eficaz los parásitos pertenecientes a los tres países.

En el primer análisis se comparó a las localidades ecuatorianas, linajes clonales peruanos y la localidad colombiana de Nariño. La heterocigosidad esperada fue mayor en la localidad de San Lorenzo que en los linajes clonales de Perú y la localidad de Nariño, esto puede estar relacionado con el hecho de que la localidad de Esmeraldas presentó alto grado de clonalidad y además a la posible importación de parásitos de las localidades vecinas (Esmeraldas y Nariño) e incluso de Perú a San Lorenzo. Otra opción posible es que la diversidad de la localidad se debe a la presencia de parásitos ancestrales que podrían encontrarse circulando en baja proporción. Los *P. falciparum* de Nariño presentaron baja heterocigosidad que se debe posiblemente a que la población de *P. falciparum* atravesó un cuello de botella poblacional hace poco tiempo (Murillo, *et al.*, 2015) disminuyendo la diversidad existente en la zona.

El grado de heterocigosidad que se observó depende del número de alelos existente en cada locus (Chenet, *et al.*, 2012; Ferreira, *et al.*, 2002). Orjuela-Sánchez, *et al.* (2013b) afirmaron que los valores bajos de heterocigosidad están relacionados a una posible reducción del

número de parásitos que sufrió una población en una zona lo que provocó la pérdida de alelos, por lo que la diversidad de los loci está correlacionada a la distribución de los diferentes alelos en una población (Mitchell, *et al.*, 2015).

Los resultados del estadístico  $F_{st}$  revelaron que uno de los linajes clonales de Perú (E) y la localidad de Esmeraldas son idénticas. Se observó que la localidad de Esmeraldas posee parásitos con el mismo haplotipo del linaje clonal E de Perú, confirmando lo encontrado por Sáenz, *et al.* (en prensa). Además, los parásitos pertenecientes al brote de *P. falciparum* que se produjo en Esmeraldas presentaron el mismo haplotipo que una muestra colectada en la Costa ecuatoriana en 1990, lo que apoya la hipótesis de que el parásito ancestral pudo ser originario de la Costa ecuatoriana o colombiana y luego haber migrado a Perú (Griffing, *et al.*, 2011). Por otra parte, la localidad de San Lorenzo presentó mayor similitud con la localidad de Nariño (Colombia), debido a la cercanía geográfica que presentan ambas localidades y a la constante migración en la zona.

Se usó el índice de asociación  $F_{ST}$ , para medir el grado de diferenciación entre localidades, y los índices de asociación  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$  para medir la diferenciación de la heterocigosidad promedio en toda la población en general y la diferenciación dentro de las localidades, respectivamente (Wright, 1951). Las localidades de Ecuador y Colombia, linajes clonales de Perú mostraron un porcentaje de variación nulo, lo que indica que el valor del índice  $F_{ST}$  fue no significativo, esto, posiblemente, está relacionado a la alta clonalidad que presentan la localidad de Esmeraldas y la localidad de Nariño (Murillo, *et al.*, 2015), y a que las muestras peruanas estaban agrupadas por linajes clonales (Griffing, *et al.*, 2011). Entre grupos el porcentaje de variación fue de 45,93%, con un  $F_{SC}$  = 0.45468, valor altamente significativo. Existe variación alta entre la composición genética de los parásitos de los tres países. Dentro

de las localidades el porcentaje de variación fue de 55,08%, con un FCT = -0,01014, valor no significativo. No existió diferenciación genética dentro de las localidades ni de los linajes clonales, a nivel estadístico; ésto significa que el porcentaje de variación genética de *P. falciparum* en los tres países no presenta diferencia significativa entre haplotipos de las zonas analizadas, lo que confirma la evidente clonalidad de las poblaciones de *P. falciparum* que se encuentran en América del Sur (Griffing, *et al.*, 2011; Larrañaga, *et al.*, 2013; Baldeviano, *et al.*, 2015; Sáenz, *et al.*, en prensa).

Para estudiar la relación genética entre las localidades ecuatorianas (Esmeraldas y San Lorenzo), linajes clonales peruanos y la localidad colombiana de Nariño se realizó una red de nexos; con el programa Network se determinó la relación genética entre localidades mediante una red de nexos entre haplotipos (Fig. 19). Se observó que la mayoría de las muestras de Esmeraldas, unas pocas de San Lorenzo y las muestras de Cascales y Jaramijó presentaron gran similitud o fueron iguales al linaje clonal E de Perú, porque ambas muestras posiblemente venían de Esmeraldas. La mayoría de las muestras de San Lorenzo mostraron mayor similitud con las muestras de Nariño, al igual que las muestras de Lago Agrio, sugiriendo que existe flujo genético entre las diferentes localidades, lo que genera diversidad genética. Algunas muestras presentaron similitud con otros linajes clonales de Perú, como por ejemplo una muestra de Aguarico que presentó mayor similitud con los linajes clonales A y B de Perú, lo que muestra que existe una continua mezcla entre las poblaciones de las localidades de los tres países analizados. A pesar de que las muestras de San Lorenzo y Nariño presentaron mayor diversidad genética se observó que permanecían cercanas entre sí. Las muestras de la Amazonia tuvieron mayor cercanía con diferentes localidades (linaje clonal A,

B de Perú, San Lorenzo y Esmeraldas) posiblemente por la constante migración de las personas por el interior del país, (debido al bajo número de muestras)

Las muestras fueron agrupadas por sus haplotipos, independientemente de su origen geográfico. Las muestras de las localidades de Perú fueron asignadas a diferentes grupos que coincidían con la agrupación por linajes clonales obtenida por Griffing, *et al.* (2011). La mayoría de las muestras de Nariño fueron agrupadas con algunas muestras ecuatorianas, esto demuestra que existe alta similitud genética entre algunas muestras de las localidades de San Lorenzo, Esmeraldas y Nariño. Además estos resultados apoyan lo observado por Murillo, *et al.* (2015), la localidad de Nariño presenta un haplotipo predominante, y apoyan a que la migración entre Ecuador y Colombia genere diversidad en ambos países. Algunas muestras de San Lorenzo, tres muestras de la Amazonia, algunas muestras de Nariño y muestras del linaje clonal D fueron agrupadas juntas. Esto demuestra que el linaje clonal D es el linaje que presenta similitud genética con el mayor número de las localidades estudiadas. Los linajes clonales A y B peruanos fueron agrupados dentro de un solo grupo debido a la similitud genética de los dos. El linaje clonal E peruano estuvo agrupado con la mayoría de las muestras de Esmeraldas, pocas muestras de San Lorenzo, confirmando que la similitud de estas localidades ecuatorianas con el linaje clonal E es muy alta, resultados que confirman lo observado por Sáenz, *et al.* (en prensa) (Fig. 20B).

En un segundo análisis se comparó a las localidades ecuatorianas, localidades peruanas y la localidad colombiana de Nariño. En la medición de la heterocigosidad esperada los valores que se obtuvieron en las muestras de Perú fueron mayores porque al estar organizadas por localidades existió mezcla de haplotipos (mezcla de linajes clonales). La heterocigosidad esperada fue mayor en 2 localidades peruanas (Caballococha [CC] y Padre Cocha [PC]) que

en el resto de localidades. Los valores altos de heterocigosidad se deben a la relación de estos parásitos con parásitos de Brasil que son más diversos (Griffing, *et al.*, 2011).

El estadístico  $F_{st}$  mostró que la localidad Zarumilla (PP) de Perú y la localidad de Esmeraldas presentaron gran similitud. No existió distancia genética entre ambas localidades, estos resultados confirmaron lo encontrado por Sáenz, *et al.* (en prensa), porque la localidad PP presenta únicamente parásitos que pertenecen al linaje clonal E.

Con los resultados del Struture 2.3.4 y una vez determinado el número de poblaciones más probable, se realizó un mapa de las localidades estudiadas para representar las diferentes poblaciones que se encontraban en estas localidades (Fig. 20C). Esmeraldas presentó 3 poblaciones (94% de las cuáles fueron idénticas), indicando una alta clonalidad debido a la expansión de parásitos presentes en la zona. San Lorenzo presentó 4 poblaciones (Grupo 1, 3, 5 y 6), presentando mayor diversidad genética que Esmeraldas. La diversidad poblacional existente en San Lorenzo se debe probablemente a la migración tanto dentro del país como fuera de él; además de la posibilidad de que existan parásitos circulantes en las zonas de estudio en pacientes asintomáticos. Las muestras de la Amazonia presentaron dos poblaciones, que no son representativas de la conformación genética de la región debido al bajo número de muestras. Nariño a su vez presentó 2 poblaciones compartidas con San Lorenzo; Zarumilla presentó únicamente 1 población compartida con Esmeraldas; Padre Cocha presentó 3 poblaciones; Ullpayacu presentó 2 poblaciones (una de ellas compartida con San Lorenzo); Pampa Hermosa presentó 2 poblaciones; Caballococha presentó 2 poblaciones (Fig. 20C). Estos resultados demuestran flujo génico de *P. falciparum* entre las distintas localidades de los tres países a pesar de ser zonas de baja transmisión para este parásito. Es importante recalcar que no se encontraron linajes únicos en ninguna de las localidades de Ecuador.

## 6.6 HALLAZGOS IMPORTANTES

*Plasmodium falciparum* es la especie causante de malaria que genera mayor mortalidad y morbilidad en el mundo. Entre los métodos principales de detección de la malaria causada por *P. falciparum* se encuentra el uso de RDTs que tienen como blanco, por lo general, a la proteína HRP2. En total, 11,87% de las muestras de *P. falciparum* ecuatorianas analizadas presentaron delección del gen *Pfhrp2*, que codifica para la proteína HRP2, y 37,29% de las muestras presentaron delección del gen *Pfhrp3*, que codifica para la proteína HRP3, lo que indica que el uso de RDTs para diagnóstico no es recomendable en esta región de Ecuador, ya que la ausencia del gen blanco de las RDTs produciría un alto número de resultados falsos negativos generando dificultad en el correcto diagnóstico de la enfermedad.

A pesar de que las localidades de Esmeraldas y San Lorenzo se encuentran geográficamente cercanas, presentan diferencia en la configuración genética de *P. falciparum*. Esto se debe a que la mayoría de las muestras de Esmeraldas son clonales, producto, en su mayoría, de un brote que tuvo lugar en la ciudad de Esmeraldas, mientras que las de San Lorenzo presentaron diversidad más alta y presencia de mayor cantidad de haplotipos debido a la alta tasa de migración tanto interna como externa (fuera del país). Debido al limitado número de muestras provenientes de la Amazonia, no se pudo determinar la estructura poblacional de la zona, ni se pudo realizar las comparaciones adecuadas con las otras localidades analizadas en este estudio. No se evidenció alta diversidad genética en los parásitos de las localidades ecuatorianas, lo que confirma lo observado en las poblaciones de América del Sur (Anderson, *et al.*, 2000, Griffing, *et al.*, 2011; Murillo, *et al.*, 2015, Baldeviano, *et al.*, 2015; Bacon, *et al.*, 2009; Echeverry, *et al.*, 2013). La baja diversidad de *P. falciparum* que se presenta en las localidades ecuatorianas implica mayor facilidad de eliminación del parásito ya que el pool

genético es limitado debido a la poca recombinación entre los haplotipos existentes. En zonas de baja transmisión muchos de los casos reportados son producto de parásitos que están altamente relacionados y los haplotipos puede permanecer por largo tiempo por la falta de recombinación (Escalante, *et al.*, 2015).

Los *P. falciparum* de Esmeraldas presentaron alta clonalidad, baja diversidad genética y alto desequilibrio de ligamiento, siendo idénticos al linaje clonal E de Perú (Griffing, *et al.*, 2011) y a un parásito colectado en la misma zona hace casi 30 años (Sáenz, *et al.*, en prensa). Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una población vestigial de parásitos originaria de Esmeraldas que migró a la costa peruana y que podría mantenerse en la población sin causar síntomas. La localidad de San Lorenzo presentó menor clonalidad y desequilibrio de ligamiento y mayor diversidad genética que la localidad de Esmeraldas. San Lorenzo presentó mayor similitud con la localidad de Nariño, Colombia, pero también compartió algunos haplotipos con zonas de Perú, lo que indica de que la zona presenta continua mezcla entre parásitos *P. falciparum* que migran del interior del país como de países vecinos (Colombia y Perú), aumentando la diversidad.

Este estudio ha servido para tener una base de la estructura de las poblaciones de *P. falciparum* ecuatorianas, principalmente de la provincia de Esmeraldas, además sugiere la creación de políticas, como la vigilancia molecular activa para identificar el origen de casos de malaria, lo que permitirá concentrar los esfuerzos de vigilancia en zonas donde hay alta migración y mantener un continuo muestreo de las zonas afectadas para la determinación de la composición genética de los parásitos. La disminución de la diversidad y el aumento del LD en los pocos focos de transmisión de *P. falciparum* implican que la eliminación es una meta alcanzable. Un esfuerzo combinado entre países vecinos que use herramientas como la que se

presenta en este trabajo en conjunto con otras como la vigilancia de resistencia a antimaláricos y la búsqueda de infecciones asintomáticas facilitarán la eliminación de la enfermedad a nivel regional.



## 7. RECOMENDACIONES

A pesar de haber obtenido resultados relevantes en las muestras estudiadas, se recomienda realizar una toma de muestra más amplia en toda la Costa y la Amazonia para poder establecer cuál es la estructura de los parásitos que se encuentran en estas zonas.

Se recomienda comparar la población de *P. falciparum* ecuatorianos con las poblaciones de otros países de América del Sur, para determinar la similitud que presentan las poblaciones y establecer si existe relación entre los parásitos de los diferentes países, para poder tratar casos importados de la mejor manera posible y evitar, de esta manera, generar cepas con mayor resistencia a las drogas.

Se recomienda realizar una comparación de las poblaciones de los parásitos en las localidades de Esmeraldas y San Lorenzo, a lo largo del tiempo, para determinar el cambio que se ha producido en la estructura poblacional de los parásitos y poder tratar a los enfermos con los medicamentos adecuados.

Recomendamos realizar un estudio de vectores para complementar el presente estudio y de esta forma, junto con el Ministerio de Salud Pública, contribuir a la creación de una política que lleve a la eliminación de la malaria.

## 8. LITERATURA CITADA

Abdallah, J., Akinyi, S., Fontecha, G., Mejia, R., Banegas, E., Matute, M., Mancero, A., Barnwell, J., Udhayakumar, V. 2015. *Prevalence of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in Puerto Lempira, Honduras*. Malaria Journal; 14(19).

Achan, J., Talisuna, A., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J., Baliraine, F., Rosenthal, P., D'Alessandro, U. 2011. *Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria*. Malaria Journal; 10(144).

Agencia Europa de Medicina (EMA). 2015. *First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA*.

Akinyi, S., Hayden, T., Gamboa, D., Torres, K., Bendezu, J., Abdallah, J., Griffing, S., Marquiño, W., Arrospide, N., De Oliveira, A., Lucas, C., Magill, A., Bacon, D., Barnwell, J., Udhayakumar, V. 2013. *Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in Plasmodium falciparum parasites from Peru*. Scientific reports; 3(2797).

Anderson, T., Su, X., Bockarie, M., Lagog, M., Day, K. 1999. *Twelve microsatellite markers for characterization of Plasmodium falciparum from finger-prick blood samples*. Parasitology; 119: 113-125.

Anderson, T., Su, X., Roddam, A., Day, K. 2000. *Complex mutations in a high proportion of microsatellite loci from the protozoan parasite Plasmodium falciparum*. Molecular Ecology; 9: 1599-1608.

Anderson, T., Haubold, B., Williams, J., Estrada-Franco, J., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I., Brockman, A., Nosten, F., Ferreira, M., Day, K. 2000b. *Microsatellite Markers Reveal a Spectrum of Population Structures in the Malaria Parasite Plasmodium falciparum*. Mol. Biol. Evol; 17(10): 1467-1482.

Andrade, B., Rocha, C., Reis-Filho, A., Aranha, L., Tadei, W., Andrade, L., Barral, A., Barral-Netto, M. 2009. *Anti-Anopheles darlingi saliva antibodies as marker of Plasmodium vivax infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon*. Malaria Journal; 8(121).

Al-Hamidhi, S., Mandy, M., Al-Hashami, Z., Al-Farsi, H., Al-mekhlafi, A., Idris, M., Beja-Pereira, A., Babiker, H. 2013. *Genetic diversity of Plasmodium falciparum and distribution of drug resistance haplotypes in Yemen*. Malar J; 12: 244.

Alves, FP., Gil, LH., Marrelli, MT., Ribolla, PE., Camargo, EP., Da Silva, LH. 2005. *Asymptomatic carriers of Plasmodium sp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon*. J Med Entomol; 42: 777–779.

Applied Biosystems. 2006. *Peak Scanner Software Version 1.0 Reference Guide*.

Arevalo-Herrera, M., Quiñones, M., Guerra, C., Céspedes, N., Giron, S., Ahumada, M., Piñeros, J., Padilla, N., Terrientes, S., Rosas, A., Padilla, J., Escalante, A., Beier, J., Herrera, S. 2012. *Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America*. Acta Trop.; 121(3): 303-314.

Arróspide, N., Hjar-Guerra, G., de Mora, D., Díaz-Cortéz, C., Veloz-Perez, R., Gutierrez, S., Cabezas-Sanchez, C. 2014. *Alelos mutantes asociados a la resistencia a Cloroquina y Sulfadixina-Pirimetamina en Plasmodium falciparum de las fronteras Ecuador-Perú y Ecuador-Colombia*. Rev. Peru Med. Exp Salud Publica; 31(2): 282-287.

Avise, J. 2012. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall book..

Bacon, D., McCollum, A., Griffing, S., Salas, C., Soberon, V., Santolalla, Haley, R., Tsukayama, P., Lucas, C., Escalante, A., Udhayakumar, V. 2009. *Dynamics of Malaria Drug Resistance Patterns in the Amazon Basin Region following Changes in Peruvian National Treatment Policy for Uncomplicated Malaria*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 53(5): 2042-2051.

Baird, JK., Hoffman, SL. 2004. *Primaquine therapy for malaria*. Clin. Infect. Dis.; 39:1336–1345.

Baker, J., McCarthy, J., Gatton, M., Kyle, D., Belizario, V., Luchavez, J., Bell, D., Cheng, Q. 2005. *Genetic Diversity of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (PfHRP2) and Its Effect on the Performance of PfHRP2-Based Rapid Diagnostic Tests*. Journal of Infectious Diseases; 192: 870-877.

Baker, J., Ho, M., Pelecanos, A., Gatton, M., Chen, N., Abdullah, S., Albertini, A., Arie, F., Barnwell, J., Bell, D., Cunningham, J., Djalle, D., Echeverry, D., Gamboa, D., Hii, J., Phone, M., Luchavez, J., Membi, C., Menard, D., Murillo, C., Nhem, S., Ogutu, B., Onyior, P., Oyibo, W., Qing, S., McCarthy, J., Cheng, Q. 2010. *Global sequence*

*variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests.* Malaria Journal; 9(129).

Baldeviano, G., Akinyi, S., Arrospide, N., Gonzalez, R., Sánchez, J., Macedo, S., Tapia, L., Salas, C., Gamboa, D., Herrera, Y., Edgel, K., Udhayakumar, V., Lescano, A. 2015. *Molecular Epidemiology of Plasmodium falciparum Malaria Outbreak, Tumbes, Peru, 2010-2012.* Emerging Infectious Diseases; 21(5): 797-803.

Bloland, P. 2001. *Drug resistance in malaria.*

Bolstad, W. 2004. *Introduction to Bayesian Statistics, John Wiley.*

Bousema, T., Drakeley, C. 2011. *Epidemiology and Invecitivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination.* Clinical Microbiology Reviews; 24(2): 377-410.

Bousema, T., Griffin, J., Sauerwein, R., Smith, D., Churcher, T., Takken, W., Ghani, A., Drakeley, C., Gosling, R. 2012. *Hitting hotspots: spatial targeting of malaria for control and elimination.* PlosOne. 9.

Bousema, T., Okell, L., Felger, I., Drakeley, C. 2014. *Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance.* Nature 12: 833-836.

Briolant, S., Henry, M., Oeuvray, C., Amalvict, R., Baret, E., Didillon, E., Rogier, C., Pradines, B. 2010. *Absence of association between piperaquine in vitro responses and*

*polymorphisms in the genes pfcr1, pfmdr 1, pfmrp and pfpr in Plasmodium falciparum.*

Antimicrob. Agents Chemother; 54:3537– 3544.

Brown, T. 2008. *Genomas*. Panamericana. Tercera edición.

Buchsbaum, R., Buchsbaum, M., Pearse, J., Pearse, V. 2013. *Animals Without Backbones*. Tercera edición. The University of Chicago Press. Chicago-EEUU. Pp 9.

Campbell, N., Reece, J. 2007. *Biología*. Médica Panamericana. 7ma edición.

Campos, I., Uribe, M., Cuesta, C., Franco-Gallego, A., Carmona-Fonseca, J., Maestre, A. 2011. *Diagnosis of Gestational, Congenital, and Placental Malaria in Colombia: Compariso of the Efficacy of Microscopy, Nested Polymerase Chain Reaction, and Histology*. Am. J. Trop. Med. Hyg; 84(6): 929-935.

Canier, L., Khim, N., Kim, S., Sluydts, V., Heng, S., Dourng, D., Eam, R., Chy, S., Khean, C, Loch, K., Ken, M., Lim, H., Siv, S., Tho, S., Masse-Navette, P., Gryseels, C., Uk, S., Van Roey, K., Peeters, K., Sokny, M., Thavrin, B., Meng, C., Deubel, V.,Durnez, L., Coosemans, M., Ménard, D. 2013. *An innovative tool for moving malaria PCR detection of parasite reservoir into the field*. Malaria Journal; 12(405).

Cañon, J., García, D., García-Atance, MA., Obexer-Ruff, G., Lenstra, JA., Ajmone-Marsan P., Dunner, S., E.C. 2006. *Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East*. Anim Genet.; 37(4): 327-334.

Carter, R., Mendis, K., Roberts, D. 2000. *Spatial targeting of interventions against malaria*. Bulletin of the World Health Organization 78: 1401-1411.

Carter R. 2001. *Transmission blocking malaria vaccines*. Vaccine. 19: 2309 -2314.

Carter, R., Mendis, K. 2002. *Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria*. Clin Microbiol Rev; 15:564–594.

CDC. 2012. *The History of Malaria, an Ancient Disease*. Tomado de <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/#chloroquine>.

CDC. 2012b. Ross and the Discovery that Mosquitoes Transmit Malaria Parasites. Tomado de <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>.

CDC. 2014. *Sop- Neutral Microsatellite Loci Analyses*.

Chassaigne, J. 2001. *Malaria y fármacos antimaláricos*. Rev. Soc. Ven. Microbiol.; 21(2).

Chenet, S., Schneider, K., Villegas, L., Escalante, A. 2012. *Local population structure of Plasmodium: impact on malaria control and elimination*. Malaria Journal; 11(412).

Corredor, V., Murillo, C., Echeverry, D., Benavides, J., Pearce, R., Roper, C., Guerra, A., Osorio, L. 2010. *Origin and Dissemination across the Colombian Andes Mountain Range of Sulfadoxine-Pyrimethamine Resistance in Plasmodium falciparum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 54(8): 3121-3125.

Cox, F. 2010. *History of the discovery of the malaria parasites and their vectors*. Parasites & Vectors; 3(5).

Crompton, P., Moebius, J., Portugal, S., Waisbergm M., Hart, G., Garver, L., Miller, L., Barillas, C., Pierce, S. 2014. *Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease*. Annu Rev Immunol. (32): 157-187.

Crooks, L., Carlborgm Ö., Marklund, S., Johansson, A. 2013. *Identification of Null Alleles and Deletions from SNP Genotypes for an Intercross Between Domestic and Wild Chickens*. G3; 3(8): 1253–1260.

Cruz, L., Spangenberg, T., Lacerda, M., Wells, T. 2013. *Malaria in South America: a drug discovery perspective*. Malaria Journal; 12(168).

Curtis, H., Bahrens, V., Schnek, A., Massarini, A. 2008. *Biología*. Buenos Aires – Argentina. Panamericana. 7ma. Edición.

Degese, M. 2009. *Malaria: Revisión de métodos de diagnóstico*.

Del Castillo, V., Uranga, R., Zafra de la Rosa, G. 2014. *Genética clínica*. El Manual Moderno.

De Salle, R., Gribet, G., Wheeler, W. 2002. *Techniques in molecular systematics and evolution*. Library of Congress Cataloging – in – Publication Data.

Díaz, A. 2009. *Diseño estadístico experimental*. Medellin – Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. 2da Edición.

Earl, D., vonHoldt, B. 2011. *STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Ecanno method*. Conservation Gent Resour.



Echeverry, D., Nair, S., Osorio, L., Menon, S., Murillo, C., Anderson, T. 2013. *Long term persistence of clonal malaria parasite Plasmodium falciparum lineages in the Colombian Pacific region*. BCM Genetics; 14(2).

Enomoto, M., Kawazu, S., Kawai, S., Furuyama, W., Ikegami, T., Watanabe, J., Mikoshiba, K. 2012. *Blockage of Spontaneous  $Ca^{2+}$  Oscillation Causes Cell Death in Intraerythrocytic Plasmodium falciparum*. PlosOne, 7.

Escalante, A., Cornejo, O., Freeland, D., Poe, A., Durrego, E., Collins, W., Lal, A. 2005. *A monkey's tale: The origin of Plasmodium vivax as a human malaria parasite*. Proc Natl Acad Sci U.S.A; 102(6):1980-1985.

Escalante, A., Ferreira, M., Vinetz, J., Volkman, S., Cui, L., Gamboa, D., Krogstad, D., Barry, A., Carlton, J., van Eijk, A., Pradhan, K., Mueller, I., Greenhouse B., Pacheco, M., Vallejo, A., Herrera, S., Felger, I. 2015. *Malaria Molecular Epidemiology: Lessons from the International Centers of Excellence for Malaria Research Network*. Am. J. Trop. Med. Hyg; 93(3): 79-86.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. *Detsecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study*. Molecular Ecology; 14(8): 2611-1620.

Feachem, R., Phillips, A., Hwang, J., Cotter, C., Wieldosz, B., Greenwood, B., Sabot, O., Rodriguez, M., Abeyasinghe, R., Fhebreyesus, T., Snow, R. 2010. *Shrinking the malaria map: progress and prospects*. The lancet; 376:1566-1578.

Ferreira, M., Nair, S., Van Hynh, T., Kawamoto, F., Anderson, T. 2002. *Microsatellite Characterization of Plasmodium falciparum from Cerebral and Uncomplicated Malaria Patients in South Vietnam*. Journal of Clinical Microbiology; 40(5): 1854-1857.

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. 2009. *Bailey & Scott's Diagnostico Microbiano*. Buenos Aires, Argentina. Panamericana. Pp:131-138.

Fluxus Technology Ltd. 2012. *Network 4.6.1.1. User Guide*.

Gamboa, D., Ho, M., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P., Barnwell, J., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J., Cheng, Q. 2010. *A Large Proportion of P. falciparum Isolates in the Amazon Region of Peru Lack pfhrp2 and pfharp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Test*. PlosOne; 5.

García, F. 2007. *Comparación de una prueba rápida con el método convencional gota gruesa para el diagnóstico de malaria en un área endémica*.

Garcia, J., Puentes, A., Patarroyo, M. 2006. *Developmental Biology of Sporozoite-Host Interactions in Plasmodium falciparum Malaria: Implications for Vaccine Design*. Clinical Microbiology Reviews; 4(19): 686–707.

Gardner, M., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R., Carlton, J., Pain, A., Nelson, K., Bowman, S., Paulsen, I., James, K., Eisen, J., Rutherford, K., Salzberg, S., Craig, A., Kyes, S., Chan, M., Nene, V., Shallom, S., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M., Vaidya, A., Martin, D., Fairlamb, A., Fraunholz, M., Roos, D., Ralph, S., McFadden, G., Cummings, L.,

Subramanian, M., Mungall, C., Venter, J., Carucci, D., Hoffman, S., Newbold, C., Davis, R., Fraser, C., Barrell, B. 2002. *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 419(6906).

Gauthier, G., Tibayrenc, M., 2005. *Population structure of malaria parasites: The driving epidemiological forces*. Acta Tropica; 94: 241-250.

Genomick. 2009. *PCR Anidada o Nested*.

González, F. 2009. *La evolución, de Darwin al genoma*. Publications de la Universitat de Valencia.

Gray, KA., Dowd, S., Bain, L., Bobogare, A., Wini, L., Shanks, GD., Cheng, Q. 2013. *Population genetics of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax and asymptomatic malaria in Tomote Province, Solomon Islands*. Malar J; 12: 429

Greenwood D. *The quinine connection*. J. Antimicrob. Chemother. 1992; 30:417–427.

Griffing, S., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Tauqeer, M., McCollum, A., Cabezas, C., Marquiño, W., Barnwell, J., Macedo, A., Lucas, C., Arrospide, N., Escalante, A., Bacon, D., Udhayakumar, V. 2011. *South American Plasmodium falciparum after the Malaria Eradication Era: Clonal Population Expansion and Survival of the Fittest Hybrids*. PlosOne; 6.

Griffing, S., Rachid, G., Mixson-Hayden, T., Sridaran, S., Tauqeer, M., Macedo, A., Barnwell, J., Escalante, A., Marins, M., Udhayakumar, V. 2013. *Historical Shifts in Brazilian P. falciparum Population Structure and Drug Resistance Alleles*. PlosOne, 8.

Griffing, S., Gamboa, D., Udhayakumar, V. 2013b. *The history of 20<sup>th</sup> century malaria control in Peru*. Malaria Journal; 12(303).

Grobusch, MP., Kremsner, PG. 2005. *Uncomplicated malaria*. Curr Top Microbiol Immunol. 295: 83–104.

Haubold, B. 2006. *Documentation for LIAN 3.5*.

Hellgren, O., Kutzer, M., Bensch, S., Valkiūnas, G. Palinauskas, V. 2013. *Identification and characterization of the merozoite surface protein 1 (msp1) gene in a host-generalist avian malaria parasite, Plasmodium relictum (lineages SGS1 and GrW4) with the use of blood transcriptome*. Malaria Journal. 12(381).

Herrera, S., Quiñones, M., Quintero, J., Corredor, V., Fuller, D., Mateus, J., Calzada, J., Gutierrez, J., Llanos, A., Soto, E., Menendez, C., Wu, Y., Alonso, P., Carrasquilla, G., Galinski, M., Beier, J., Arevalo-Herrera, M. 2012. *Prospects for malaria elimination in non-Amazonian regions of Latin America*. Acta Trop.; 121(3): 315-323.

Honigsbaum, M. 2001. *The Fever Trail – The Hunt for the Cure for Malaria*. London: Pan Macmillan.

Hsu, E. 2006. *Reflections on the ‘discovery’ of the antimalarial qinghao*. Br J Clin Pharmacol; 61:666– 670.

Jennison, C., Arnott, A., Tessier, N., Tavul, L., Koepfli, C., Felger, I., Siba, P., Reeder, J., Bahlo, Mueller, I., Barry, A. 2015. *Plasmodium vivax* Populations Are More Genetically Diverse and Less Structured than Sympatric *Plasmodium falciparum* Populations. PLoS Negl Trop Dis.; 9(4).

Jobling, M., Hollox, E., Hurles, M., Kivisild, T., Tyler-Smith, C. 2004. *Human evolutionary genetics*. Garland Science.

Karunaweera, ND., Ferreira, MU., Munasinghe, A., Barnwell, JW., Collins, WE., King, CL., Kawamoto, F., Hartl, DL., Wirth, DF. 2008. *Extensive microsatellite diversity in the human malaria parasite Plasmodium vivax*. Gene; 410(1): 105-112.

Koita, O., Doumbo, O., Ouattara, A., Tall, L., Konaré, A., Diakité, M., Diallo, M., Sagara, I., Masinde, G., Doumbo, S., Dolo, A., Tounkara, A., Traoré, I., Krogstad, D. 2012. *False-Negative Rapid Diagnostic Tests for Malaria and Deletion of the Histidine-Rich Repeat Region of the hrp2 Gene*. Am. J. Trop. Med. Hyg; 82(2): 194-198.

Kutschera, U., Niklas, K. 2004. *The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis*. Naturwissenschaften; 91:255-276

Larrañaga, N., Mejía, R., Hormaza, J., Montoya, A., Soto, A., Fontecha, G. 2013. *Genetic structure of Plasmodium falciparum populations across the Honduras-Nicaragua border*. Malaria Journal; 12(354).

Laishram, D., Sutton, P., Nanda, N., Sharma, V., Sobti, R., Carlton, J., Joshi, H. 2012. *The complexities of malaria disease manifestations with focus on asymptomatic malaria*. Malaria Journal; 11(29).

Legua, P. 1994. *Malaria en Perú*. Rev Med Herediana; 5(3): 115-117.

Liang, X-T., Fang, W-S. 2006. *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. Hoboken: Wiley InterScience.

Lopez-Perez, M., Villasis, E., Machado, R., Póvoa, M., Vinetz, J., Blair, S., Gamboa, D., Lustigman, S. 2012. *Plasmodium falciparum Field Isolates from South America Use an Atypical Red Blood Cell Invasion Pathway Associated with Invasion Ligand Polymorphisms*. PlosOne; 7.

Lorenz, V., Karanis, G, Karanis, P. 2014. *Malaria Vaccine Development and How External Forces Shape It: An Overview*. Int. J. Environ Res Public Health; 11(7): 6791-6807.

Lucchi, N., Karell, M., Journal, I., Rogier, E., Goldman, I., Ljolje, D., Huber, C., Mace, K., Jean, S., Akom, E., Oscar, R., Buteau, J., Boncy, J., Barnwell, J., Udhayakumar, V. 2014. *PRT-PCR method for the molecular detection of malaria parasites in a national malaria surveillance study in Haiti, 2011*. Malaria Journal; 13(462).

Lucchi, N., Narayanan, J., Karell, M., Xayavong, M., Kariuki, S., DaSilva, A., Hill, V., Udhayakumar, V. 2013. *Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR*. PlosOne. 8.

Laurent Excoffier. 2011. *Arlequin ver 3.5.1.3. user Manual*.

Machado, R., Póvoa, M., Calvosa, V., Ferreira, M., Rossit, A., dos Santos, E., Conway, D. 2004. *Genetic Structure of Plasmodium falciparum Populations in the Brazilian Amazon Region*. Journal of Infectious Diseases; 190: 1547-1555.

Martínez, P., Figueras, A. 2012. *Genética y genómica en acuicultura*. Clima Press.

McCollum, A., Soberon, V., Salas, C., Santolalla, M., Udhayakumar, V., Escalante, A., Graf, P., Durand, S., Cabezas, C., Bacon, D. 2014. *Genetic variation and recurrent parasitaemia in Peruvian Plasmodium vivax populations*. Malar J.; 13(67).

Mitchell, A. 2005. *La Guía de Esri para el análisis SIG*, Esri Press.

Mitchell, M., Locatelli, S., Sesink, P., Thomassen, H., Goner, M. 2015. *Environmental variation and rivers govern the structure of chimpanzee genetic diversity in a biodiversity hotspot*. BMC Evolutionary Biology; 15(1).

Ministerio de Salud Pública (MSP). 2011. *Situación de la Malaria, Tendencia Actual y Desafíos para su Control en Ecuador*.

Ministerio de Salud Pública (MSP). 2012. *Ecuador líder en la lucha contra el paludismo en Las Américas 2012*.

Ministerio de Salud Pública (MSP). 2013. *Día del paludismo: considerable disminución de casos y cero mortalidad en Ecuador*.

Ministerio de Salud Pública (MSP). 2015. *Gaceta epidemiológica semanal No. 19, Sive Alerta*.

Mobegi, V., Loua, K., Ahouidi, AD., Satoguina, J., Nwakanma, DC., Amambua-Ngwa A., Conway, DJ. 2012. *Population genetic structure of Plasmodium falciparum across a region of diverse endemicity in West Africa*. Malaria Journal; 11(223).

Moll, K., Kaneko, A., Scherf, A., Wahlgren, M. 2013. *Methods in Malaria Research*. Sexta edición.

Murillo, C., Akinyi, S., Abdallah, J., Pava, Z., Dorado, E., Incardona, S., Huber, C., de Oliveira, A., Bell, D., Udhayakumar, V., Barnwell, J. 2015. *Deletion of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombia Parasites*. PlosOne

Nakanjako, D., Kiragga, A., Castelnuevo, B., Kyabayinze, D., Kamya, M. 2011. *Low prevalence of Plasmodium falciparum antigenaemia among asymptomatic HAART-treated adults in an urban cohort in Uganda*. Malaria Journal; 10(66).

Negroni, M. 2009. *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*.

Nei, M. 1973. *Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA; 70(12): 3321-3323.

Oehring, S., Woodcroft, B., Moes, S., Wetzel, J., Dietz, O., Pulfer, A., Dekiwadia, C., Maeser, P., Flueck, C., Witmer, K., Brancucci, N., Niederwieser, I., Jenoe, P., Ralph, S., Voss, T. 2012. *Organellar proteomics reveals hundreds of novel nuclear proteins in the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Genome Biology; 13(11).



Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J., Clària, J. 2004. *Genética médica*. Universidad de Barcelona.

OPS. 2008. *Perfil de los sistemas de Salud – Ecuador*.

Orjuela-Sánchez, P., Brandi, M., Ferreira, M. 2013. *Microsatellite Analysis of Malaria Parasites*. *Methods in Molecular Biology*; 1006:247-258.

Orjuela-Sánchez, P., Sá, J., Brandi, M., Rodrigues, P., Bastos, M., Amaratunga, C., Duong, S., Fairhurst, R., Ferreira, M. 2013b. *Higher microsatellite diversity in Plasmodium vivax than in sympatric Plasmodium falciparum populations in Pursat, western Cambodia*. *Exp Parasitol*; 134(3): 318-326.

Oyebola, M., Idowu, E., Nyang, H., Olukosi, Y., Otubanjo, O., Nwakanma, D., Awolola, S., Amambua-Ngwa, A. 2014. *Microsatellite markers reveal low levels of population sub-structuring of Plasmodium falciparum in southwestern Nigeria*. *Malaria Journal*; 13(493).

Pacheco, M., Reid, M., Schillaci, M., Lowenberger, C., Galdikas, B., Jones-Engel, L., Escalante, A. 2012. *The Origin of Malaria Parasites in Orangutans*. *PlosOne*; 7.

Parida, S., Pandit, A., Gaikwad, K., Sharma, T., Shankar, P., Singh, N., Mohapatra, T. 2010. *Functionally relevant microsatellites in sugarcane unigenes*. *BMC Plant Biology*; 10(251).

Passarge, E. 2010. *Color Atlas of Genetics*. Panamericana. Tercera edición.

Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. *GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Molecular Ecology Notes. 6, 288-295.

Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F. 2005. *Data analysis methods*. (P. Hamon, M. Deguin, X. Perrier, J. C. Glaszmann, Edits.) Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, 43-76.

Pinault, L., Hunter, F. 2011. *Malaria Knowledge, Concern, Land Management, and Protection Practices among Land Owners and/or Managers in Lowland versus Highland Ecuador*. Malaria Research and Treatment; 2011.

Pinault, L., Hunter, F. 2012. *Malaria in Highlands of Ecuador since 1900*. Emerging Infectious Diseases; 18(4): 615-622.

Pinault, L., Hunter, F. 2012b. *Larval habitat associations with human land uses, roads, rivers, and land cover for Anopheles albimanus, A. pseudopunctipennis, and A. punctimacula (Diptera: Culicidae) in coastal and highland Ecuador*. Frontiers in Physiology; 3.

Pribluda, V., Barojas, A., Añez, A., López, C., Figueroa, R., Herrera, R., Nakao, G., Nogueira, F., Pianetti, G., Povia, M., Vianam G., Mendonça, M., Escobar, J., Muloz, O., Rendon, S., Veloz, R., Silva, M., Aldás, M., HindsSemple, A., Collins, M., Ceron, N., Krishnalall, K., Adhin, M., Bretas, G., Hernandez, N., Mendoza, M., Smine, A., Chibwe, K., Lukulay, P., Evans, L. 2012. *Implementation of basic quality control tests for malaria*

*medicines in Amazon Basin countries: results for the 2005-2010 period.* Malaria Journal; 11(202).

Pritchard, J., Wen, X., Falush, D. 2010. *Documentation for structure software: Version 2.3.*

Reece, A., Hobbins, J. 2010. *Obstetricia Clínica.* Panamericana. Tercera edición.

Rojo-Marcos, G., Cuadros-Gonzalez, J., Gete-Garcia, L., Gomez-Herruz, P., Lopez-Rubio, M., Esteban-Gutierrez, G. 2011. *Plasmodium ovale infection: description of 16 cases and a review.* Enferm Infecc Microbiol Clin.; 29: 204–208.

Rowe, JA., Claessens, A., Corrigan, RA., Arman, M. 2009. *Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications.* Expert Reviews in Molecular Medicine; 11.

Russell, B., Suwanarusk, R., Lek, U. 2006. *Plasmodium vivax genetic diversity: microsatellite length matters.* Trends Parasitol; 399-401.

Sá, J., Chong, J., Wellems, T. 2011. *Malaria drug resistance: new observations and developments.* Essays Biochem; 51: 137-160.

Sáenz, FE., Morton, L., Akinyi, S., Valenzuela, G., Vera, CA., Velez, E., Lucchi, N., Castro, LE., Udhayakumar, V. artículo en revisión. *Clonal population expansion in an outbreak of Plasmodium falciparum on the Northwest coast of Ecuador.* Artículo en prensa.

Saitou, N., Nei, M. 1987. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol; 4(4): 406-425.

Schwartz, L., Brown, G., Genton, B., Moorthy, V. 2012. *A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table*. Malaria Journal. 11(11).

Sharma, Y. 1988. *Genomic organization, structure and possible function of Histidine-Rich Proteins of Malaria Parasites*. Int. J. Biochem.; 20(5): 471-477.

Shi, Y., Hasnain, S., Sacchi, J., Holloway, B., Fujioka, H., Kumar, N., Wohlhueter, R., Hoffman, S., Collins, W., Lal, A. 1999. *Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a recombinant multistage Plasmodium falciparum candidate vaccine*; Proc, Natl. Acad, Sci, USA. 96:1615-1620.

Sinka, M., Bangs, M., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C., Hemingway, J., Patil, A., Temperley, W., Gething, P., Kabaria, C., Okara, R., Van Boeckel, T., Godfray, H., Harbach, R., Hay, S. 2010. *The dominant Anopheles vectors of human malaria in Africa, Europe and Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis*. Parasites & Vectors; 3:117.

Singh, B., Daneshvar, C. 2013. *Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi*. Clinical Microbiology Reviews: 26(2): 165-184.

*Salud Mesoamerica, 2015.*

SNEM. 2014. *Datos reportados por el Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores*.

SNEM. 2015. Reporte de casos anual.

Solari, A. 2007. *Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. Panamericana. Tercera edición.

Snounou, G. 1996. *Detection and Identification of the Four Malaria Parasite Species Infecting Humans by PCR Amplification*. Methods in Molecular Biology. 50.

Szpiech, Z., Rosenberg, N. 2011. *On the size distribution of private microsatellite alleles*. Theor Popul Biolo; 80(2): 100-113.

Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., Krudsood, S. 2009. *Malaria Diagnosis: A Brief Review*. Korean J Parasitol; 47(2): 93-102.

Thera, M., Plowe, C. 2012. *Vaccines for Malaria: How Close Are We?*. Annu Rev Med; 63: 345-357.

Tibayrenc, M., Ayala, F. 2002. *The Clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on*. Trends in Parasitology; 18(9): 405-410.

Udhayakumar, V., Barnwell, J., de Oliveira, A. 2013. *Vigilancia molecular de la resistencia de Plasmodium falciparum a los antimaláricos (de 2005 a 2012)*.

Valenzuela, G. 2013. *Genotipos de diversidad genética y resistencia a antimaláricos en Plasmodium ecuatorianos*.

Walker, J., Rapley, R. 2009. *Molecular Biology and Biochemistry*. Quinta edición. The Royal Society of Chemistry. Pg.83.

WHO. 1996. *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias*. Segunda edición. Tomado de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.5.1.html#Jh2924s>.

WHO. 2000. *Malaria transmission blocking vaccines: An ideal public good*.

WHO. 2009. *World Malaria report 2009*.

WHO. 2010. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. 2da edición.

WHO. 2012. *Informe Mundial sobre el Paludismo*.

WHO. 2013. *World Malaria Report 2013*.

WHO. 2014. *World Malaria Report 2014*.

WHO. 2014b. *Malaria Vaccine Rainbow Tables*.  
[http://www.who.int/vaccine\\_research/links/Rainbow/en/index.html](http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html).

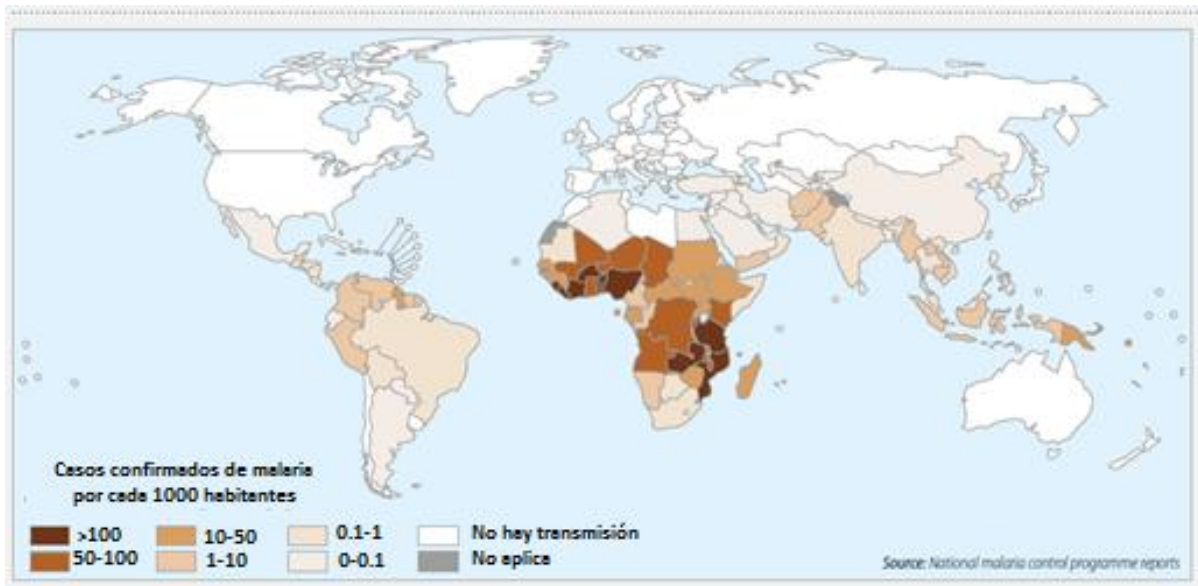
Wright, S. 1951. *The genetical structure of populations*. Ann Eugen.

Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Aiana, J., Anderson, T., Aubouy, A., Balloux, F., Besnard, P., Bogueau, H., Carnevale, P., D'Alessandro, U., Fontenille, D., Gamboa, D., Jombart, T., Le Mire, J., Leroy, E., Maestre, A., Mayxay, M., Ménard, D., Musser, L., Newton, P., Nkoghe, D., Noya, O., Ollomo, B., Rogier, C., Veron, V., Wide, A., Zakeri, S., Carme, B., Legrand, E., Chevillon, C., Ayala, F., Renaud, F., Prugnolle, F. 2012. *Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America*. PNAS; 109(2): 511-516.

Zoghi, S., Mehrizi, A., Raeisi, A., Haghdooost, A., Turki, H., Safari, R., Ahmadi, A., Zakeri, S. 2012. *Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme*. Malaria Journal; 11(126).

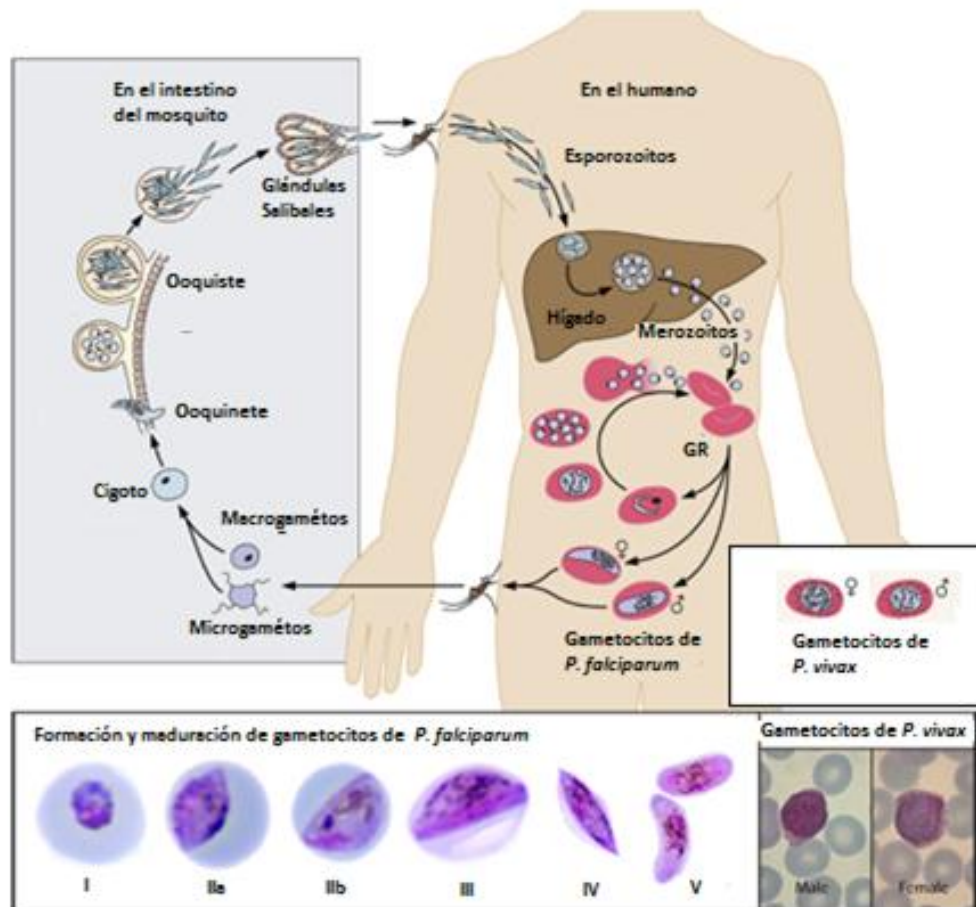
Zuckerberg, C., Barcat, J. 2007. *Alphonse Laveran y la malaria*. Medicina (Buenos Aires): 67(2):763-766.

## 9. FIGURAS



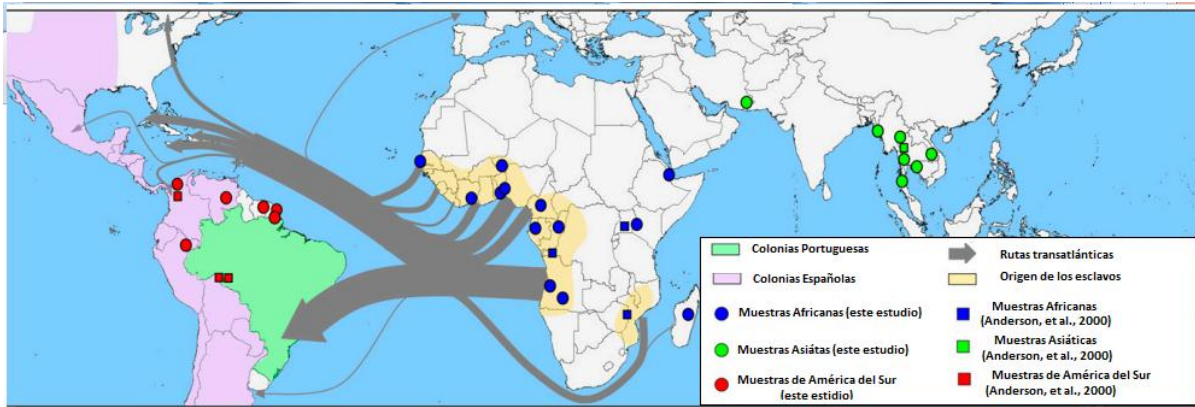
**Figura 1. Distribución de malaria en el mundo.** Los colores indican el número de casos de malaria confirmados por cada 1000 habitantes-(índice parasitario anual-IPA). Mientras más oscuro es el color mayor número de casos han sido reportados (Modificado de WHO, 2014).





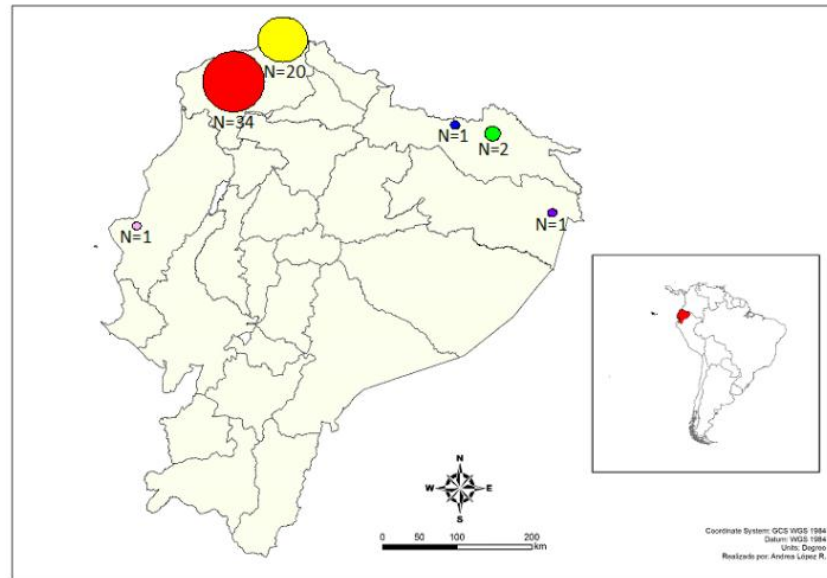
**Figura 2. Ciclo de vida del parásito *P. falciparum* y desarrollo de gametocitos.** Con la inoculación del parásito en la saliva del mosquito hembra, del género *Anopheles*, entran esporozoitos que viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado, donde se transforman en esquizontes. Al madurar los esquizontes explotan y liberan merozoitos que invaden los glóbulos rojos, en donde se transforman en trofozoitos, esquizontes y se liberan al torrente sanguíneo para infectar nuevos glóbulos rojos y continuar con el ciclo eritrocítico. Los trofozoitos pueden transformarse en gametocitos que son transmitidos a un nuevo mosquito que pique al ser humano infectado. Una vez que el mosquito ingiere la sangre infectada y esta llega al estómago los gametocitos se diferencian entre macrogametos y microgametos, se fusionan formando un cigoto que se transforma en ooquinate que ingresa a la pared del

estómago y se convierte en ooquiste. Dentro del ooquiste se desarrollan esporozoitos, que cuando son liberados viajan a las glándulas salivales, desde donde pueden ser transmitidos a un nuevo hospedero humano (Modificado de Bousema & Drakeley, 2011).

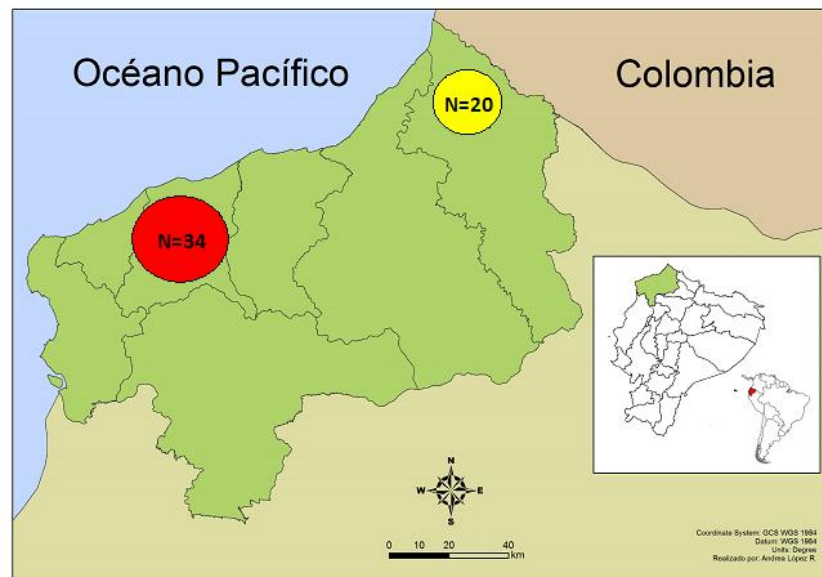


**Figura 3. Migración de *P. falciparum* entre los siglos XVI y XIX.** Se muestran las principales rutas por donde se llevaban a los esclavos y el destino de estos viajes en América del Sur. Los círculos representan las poblaciones muestreadas y los colores representan la procedencia de las muestras. Debido a las diferentes rutas de los esclavos, las poblaciones de *P. falciparum* en América del Sur están subdivididas en al menos dos grupos genéticos principales: el del norte que incluye a las poblaciones colombianas y el del sur que incluye las poblaciones de Guyana Francesa, Brasil y Bolivia. La zona de transición entre las dos zonas está representada por las poblaciones de Venezuela y Perú (modificado de Yalcindag, *et al.* 2012).

a.



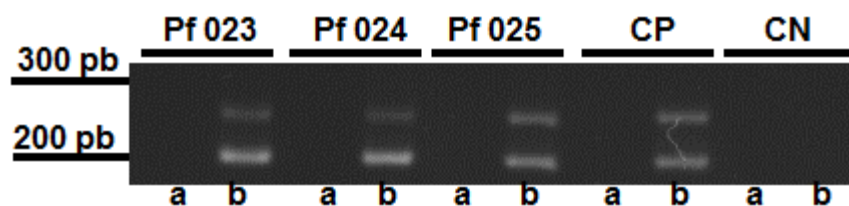
b.



**Figura 4. Mapa de distribución de las muestras de *P. falciparum* utilizadas en el estudio.**

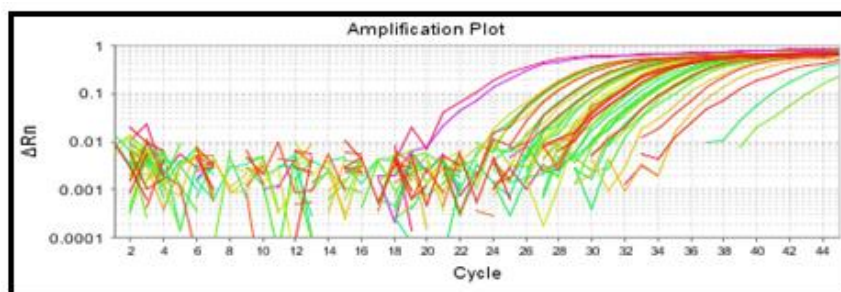
Se usaron un total de 59 muestras de *P. falciparum* provenientes de las Provincias de Esmeraldas, Manabí, Orellana y Sucumbíos **a.** Muestras utilizadas en este estudio en un mapa del Ecuador dividido por provincias. **b.** Muestras de la provincia de Esmeraldas utilizadas en

este estudio (mapa dividido por cantones). Los diferentes colores representan el origen de las muestras (cantón al que pertenece la muestra); Rojo: Esmeraldas, amarillo: San Lorenzo, rosado: Jaramijó, Verde: Lago Agrio, Morado: Aguarico; Azul: Cascales. La mayoría de muestras pertenecen a la parroquia de Vuelta Larga (N=21), Cantón Esmeraldas, Provincia de Esmeraldas, el resto de muestras vienen de la Costa y la Amazonia. (mapa: Lopez, CIEIC, 2015).

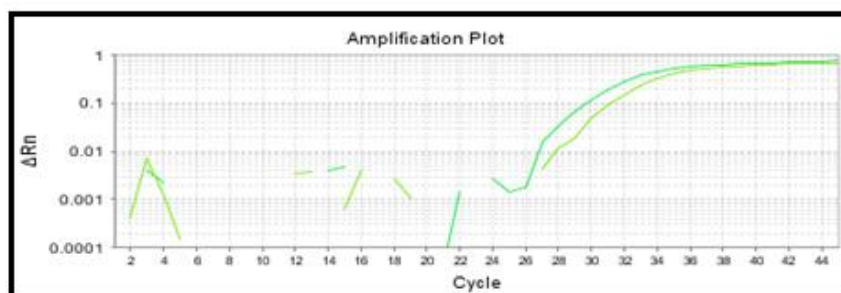


**Figura 5. PCR anidada para determinar la especie *P. falciparum*.** Se observa la presencia de una banda de 200 pb que identifica a *P. falciparum* tomando como referencia la escalera molecular 100bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) **a.** PCR1, **b.** PCR2, CP. Control Positivo, CN. Control Negativo.

A.



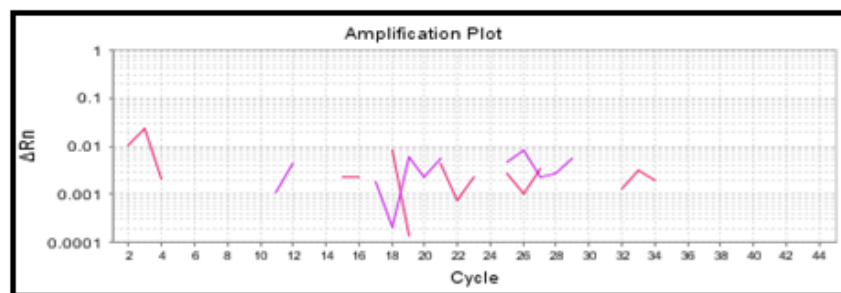
B.



C.



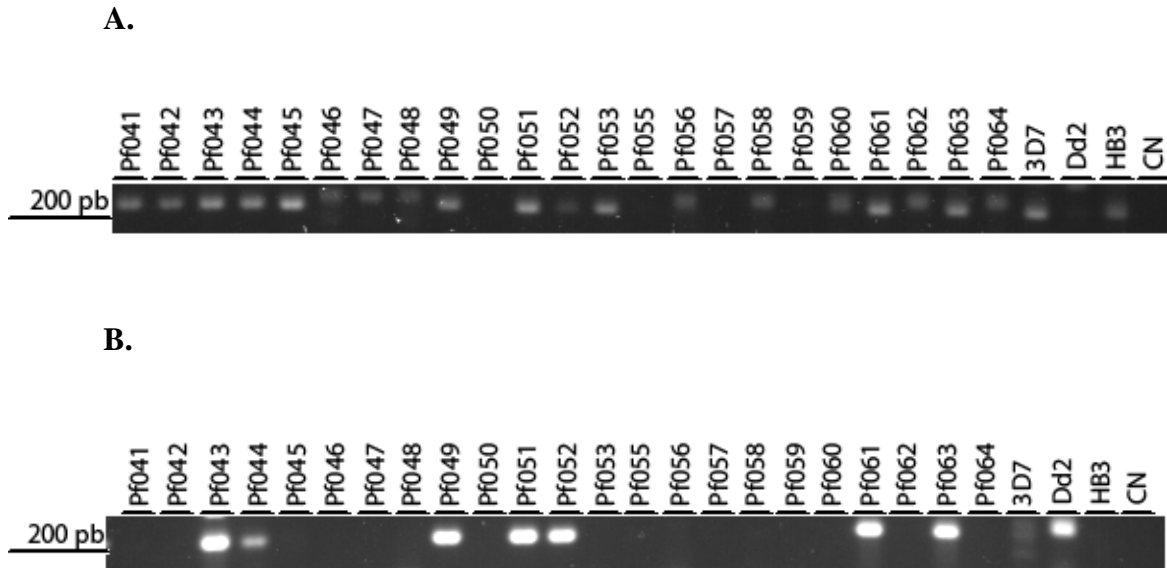
D.



**Figura 6. PCR-PET para reconfirmar la especie *P. falciparum*.** **A.** curvas de amplificación de todas las muestras con los controles positivo y negativo. **B.** curva de amplificación de la muestra Pf053. **C.** curva de amplificación del control positivo. **D.** curva de amplificación del

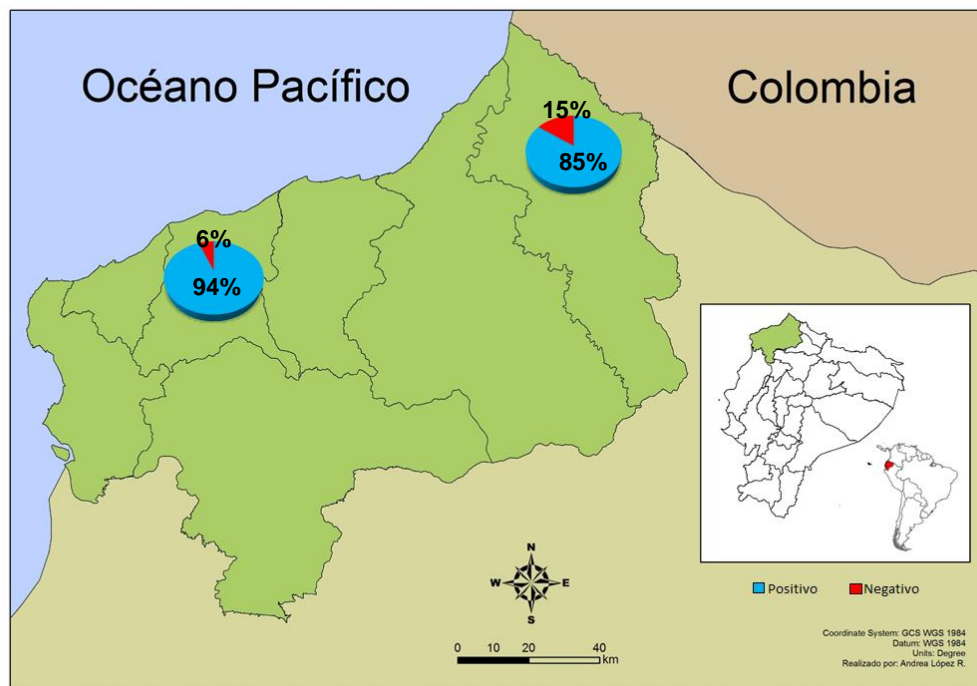
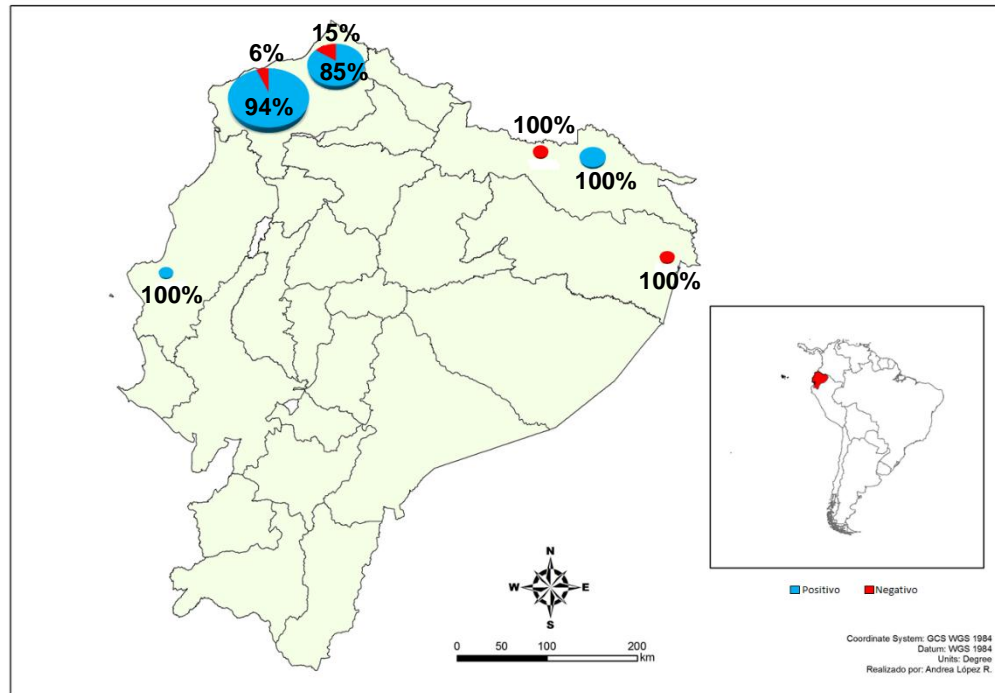
control negativo. Los valores de CT (número de ciclos donde la fluorescencia supera el umbral) mayores a 40,5 se consideran negativos.



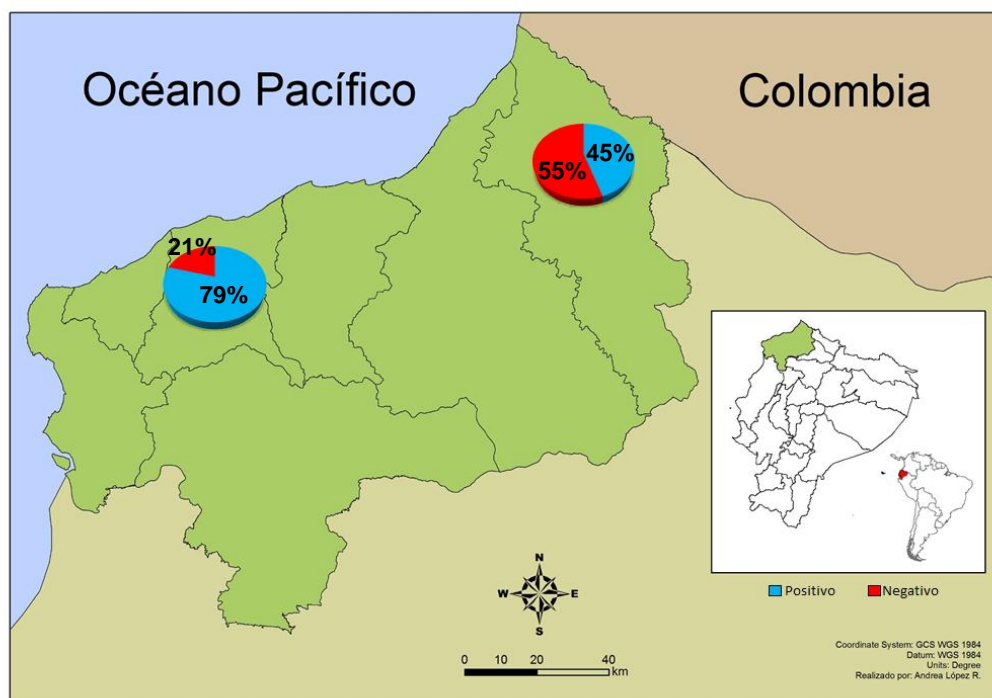
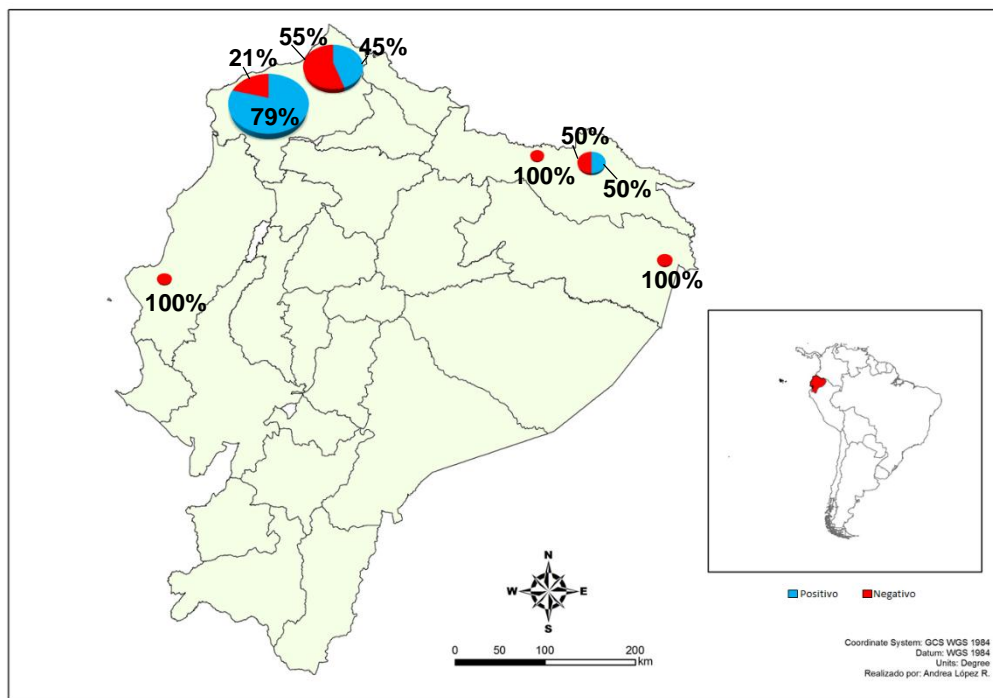


**Figura 7. PCR anidada para determinar la presencia de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en las muestras Pf41-Pf64. Se observa una banda de 200 pb, que confirma la presencia del gen tomando como referencia la escalera molecular 100bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) **A.** *Pfhrp2*. **B.** *Pfhrp3*. CP, Control Positivo. CN, Control Negativo. La ausencia de banda es por la ausencia de amplificación del gen que puede ocurrir por la delección del mismo.**

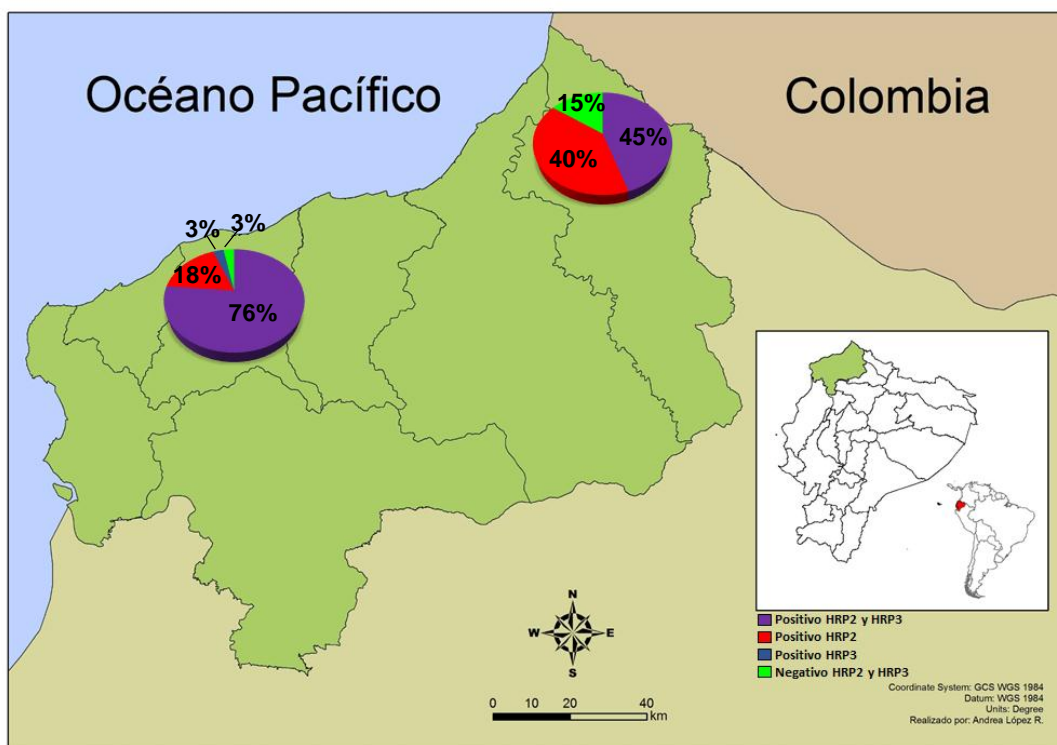
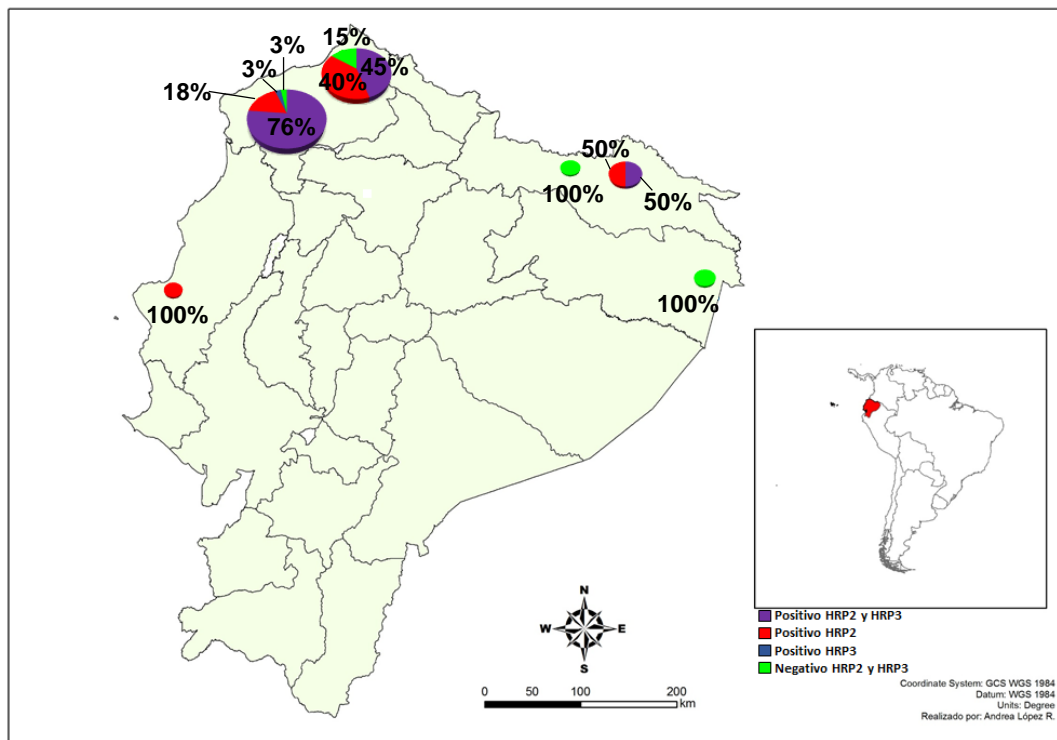
A.



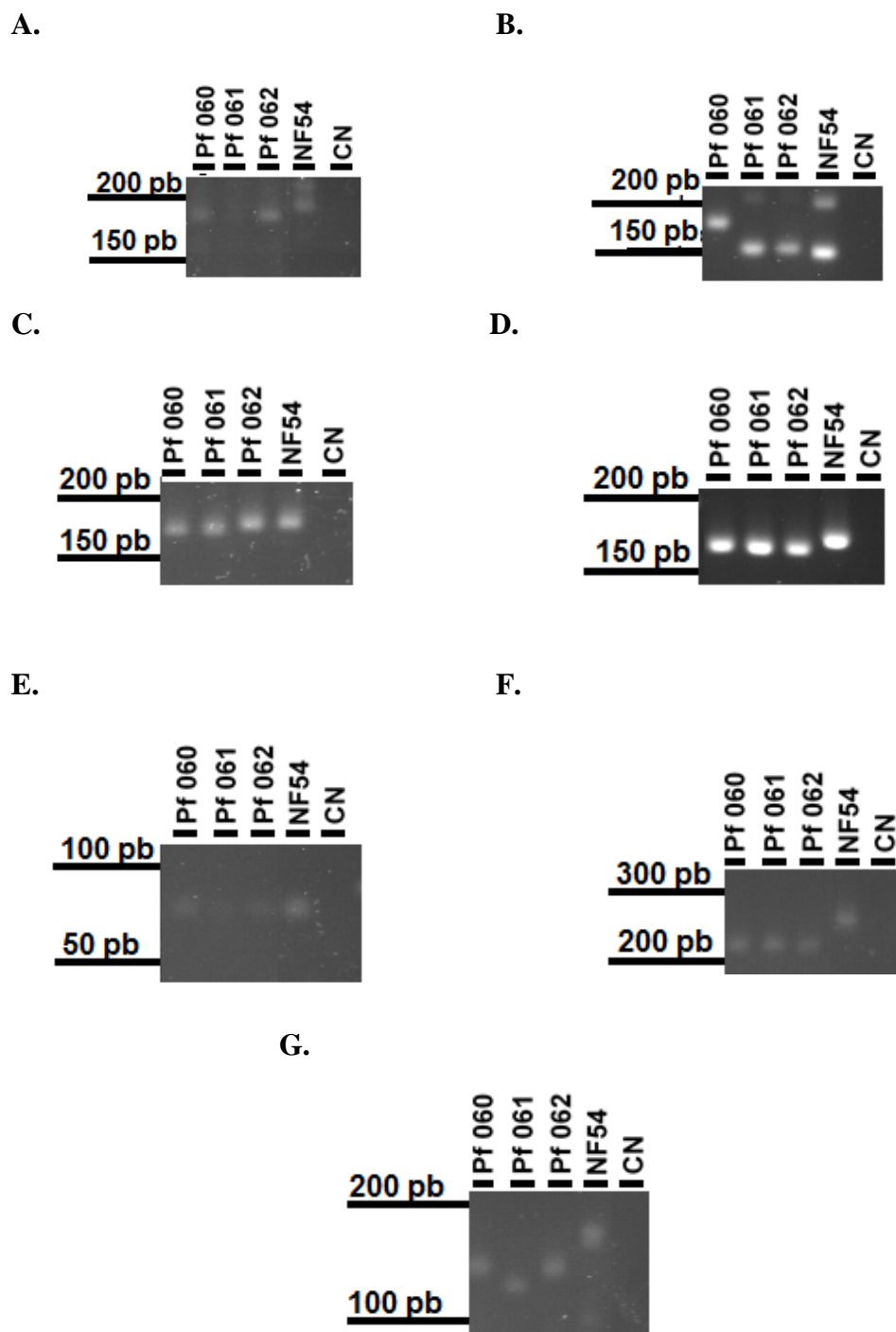
B.



C.

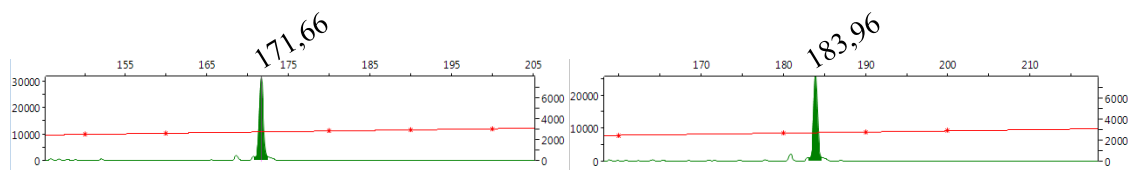
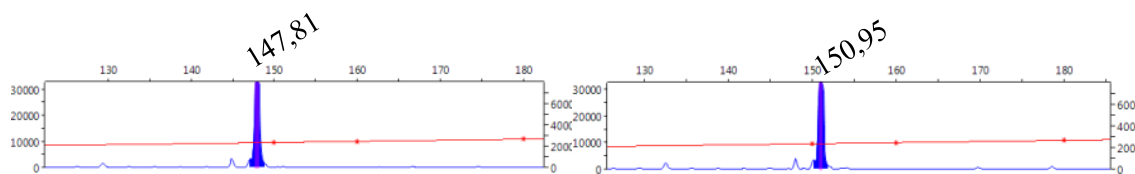
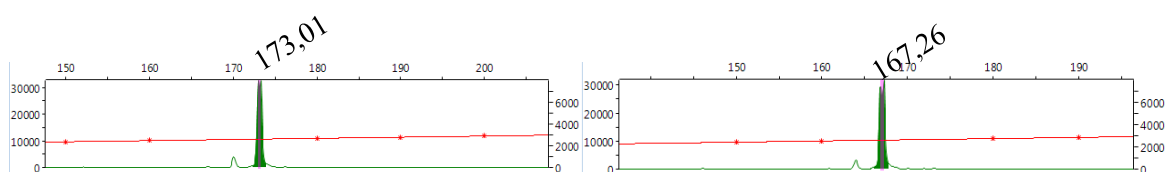
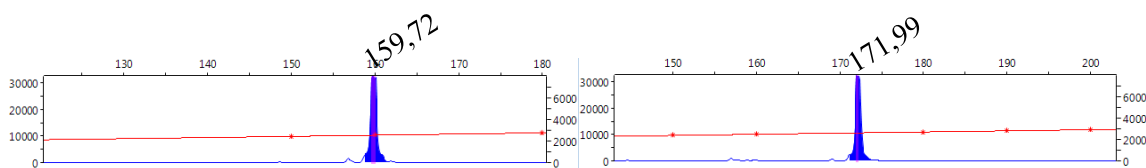
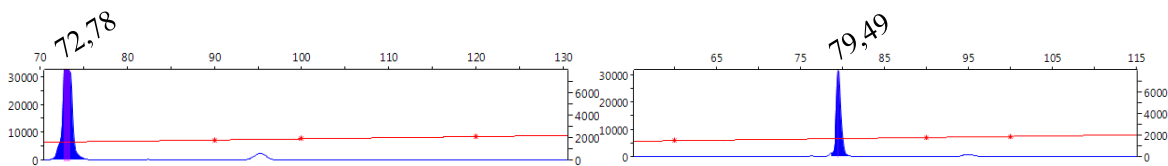
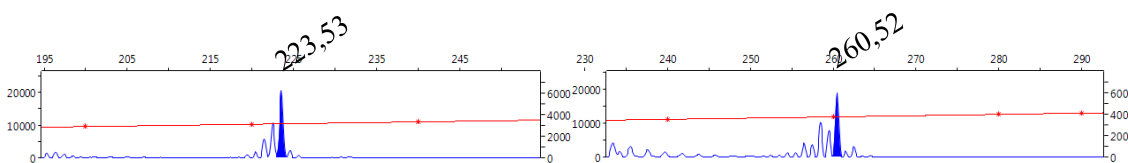


**Figura 8. Mapa de la distribución de/los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3*. A. *Pfhrp2*. B. *Pfhrp3*. C. *Pfhrp2* y *Pfhrp3*.** Se observa la distribución geográfica de las muestras según su localidad de origen. En el mapa superior se puede apreciar las muestras utilizadas en este estudio en un mapa del Ecuador dividido por provincias y en el mapa inferior las muestras de la provincia de Esmeraldas utilizadas en este estudio (mapa dividido por cantones). La prevalencia de los parásitos que presentan el gen *Pfhrp2* es mayor a la prevalencia de los parásitos que presentan el gen *Pfhrp3*, la prevalencia de parásitos que no presentan el gen *Pfhrp2* ni el gen *Pfhrp3* fue 10,17%.



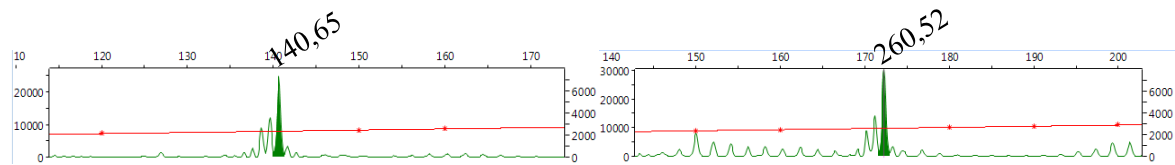
**Figura 9. Amplificación de marcadores microsatelitales** utilizados en este estudio en muestras Pf060-Pf062. **A.** TA1 se encuentra en el rango de entre 150 y 200 pb, aproximadamente. **B.** Poly- $\alpha$  se encuentra en el rango de entre 150 y 200 pb,

aproximadamente. **C.** PfPK2 se encuentra en el rango de entre 160 y 170 pb, aproximadamente. **D.** TA109 se encuentra en el rango de entre 160 y 180 pb, aproximadamente. **E.** 2490 se encuentra en el rango de entre 50 y 90 pb, aproximadamente. **F.** C2M34 se encuentra entre el rango de entre 200 y 300 pb, aproximadamente. **G.** C3M69 se encuentra en el rango de entre 100 y 175 pb, aproximadamente. NF54 . Controles Positivos. CN. Control Negativo.

**A.****B.****C.****D.****E.****F.**

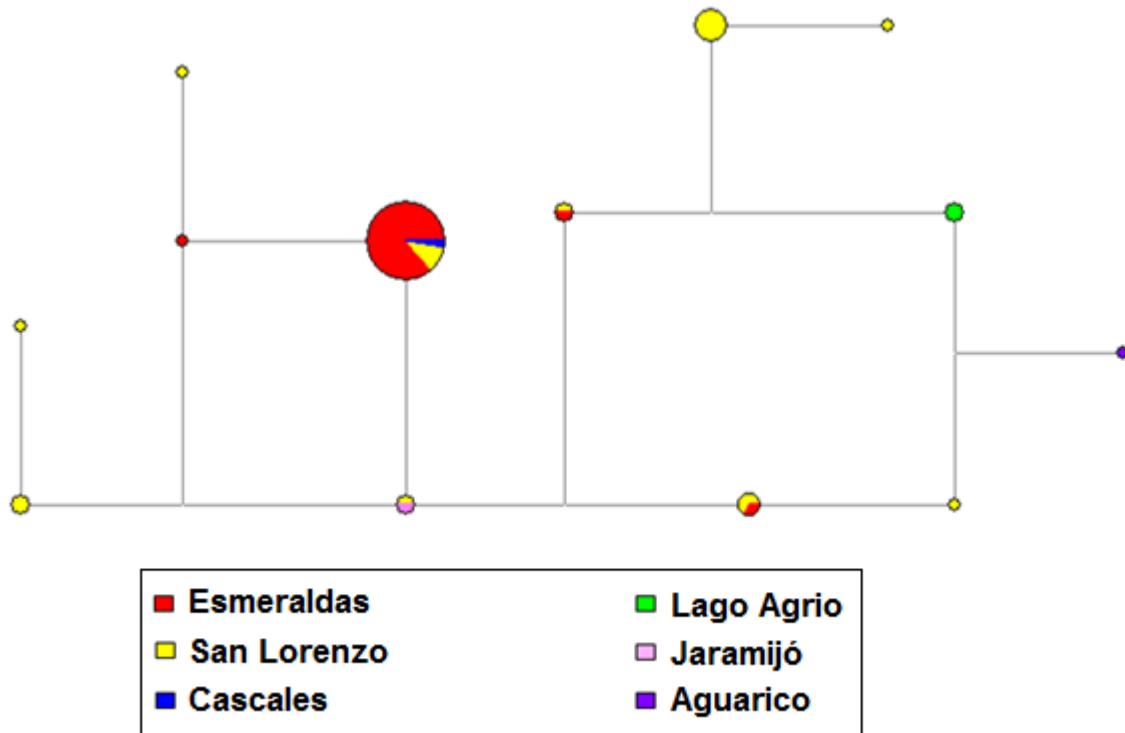


**G.**

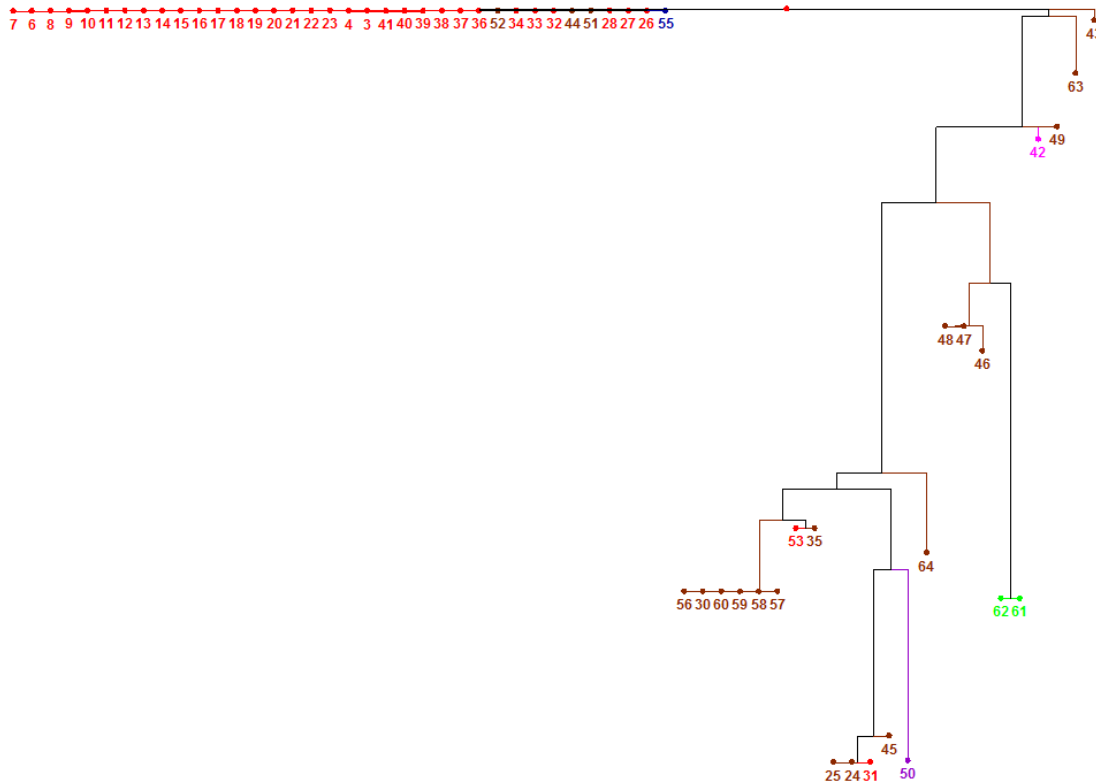


**Figura 10. Tamaño de microsatélites usados en este estudio por análisis de fragmentos.**

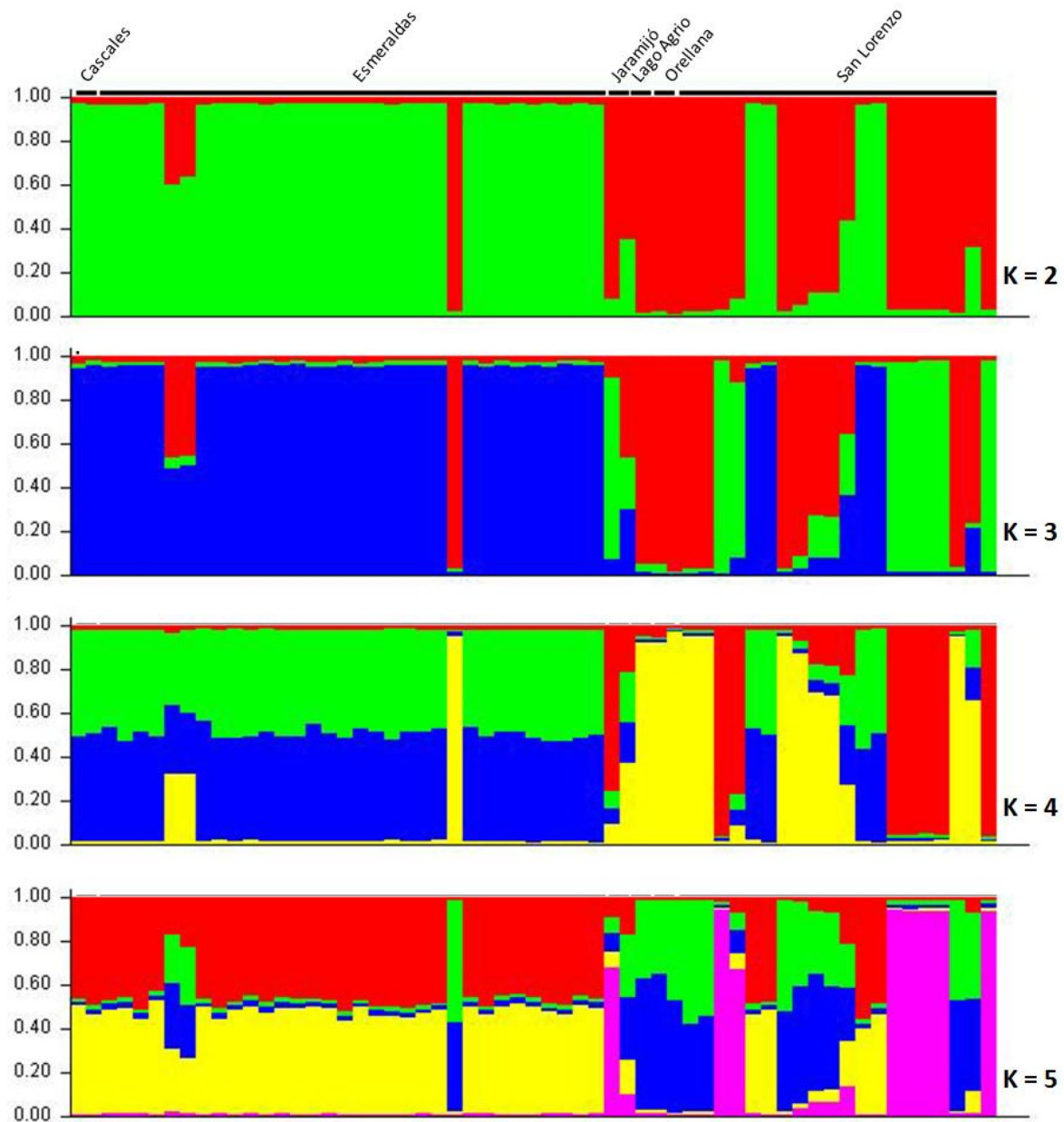
Determinados por el software Peak Scanner. Ejemplos de curvas que muestran picos de cada microsatélite en la muestra Pf033 (izquierda) y en el control NF54 (derecha) **A.** TA1. **B.** Poly-a. **C.** PfPK2. **D.** TA109. **E.** 2490. **F.** C2M34. **G.** C3M69.



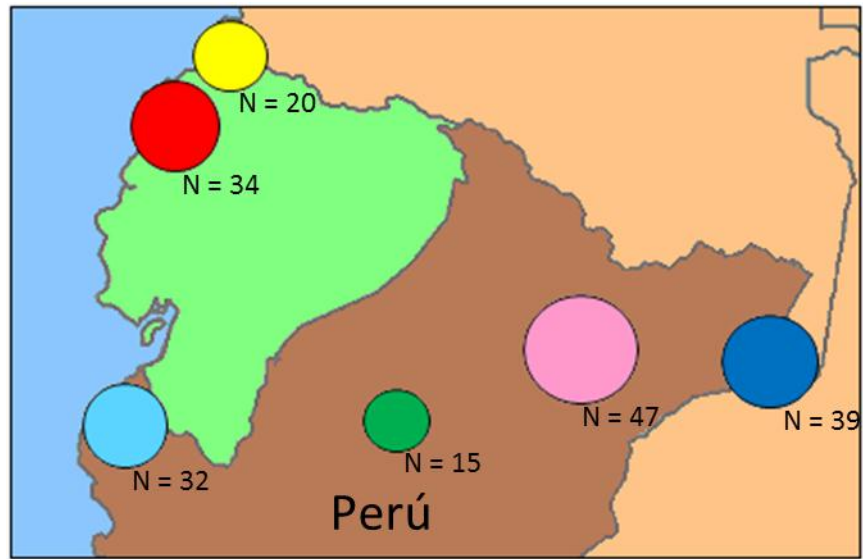
**Figura 11. Red de relaciones genéticas entre *P. falciparum* ecuatorianos.** Red realizada con el programa Network 4.6.1.3 que muestra la relación genética entre las muestras ecuatorianas colectadas en las Provincias de Esmeraldas, Manabí, Orellana y Sucumbíos en los años 2013 y 2014, usando 7 marcadores microsatélites neutrales. El tamaño de los círculos representa la cantidad de muestras que presentan el mismo haplotipo y los colores representan el lugar de procedencia de las muestras. La mayoría de las muestras de Esmeraldas presentan un haplotipo único. Una muestra de Esmeraldas tiene un solo locus diferente, las muestras de San Lorenzo muestran mayor diferenciación entre ellas y entre las muestras de Esmeraldas, y las muestras de la Amazonia se encuentran dispersas por la red, mostrando diferencia entre ellas.



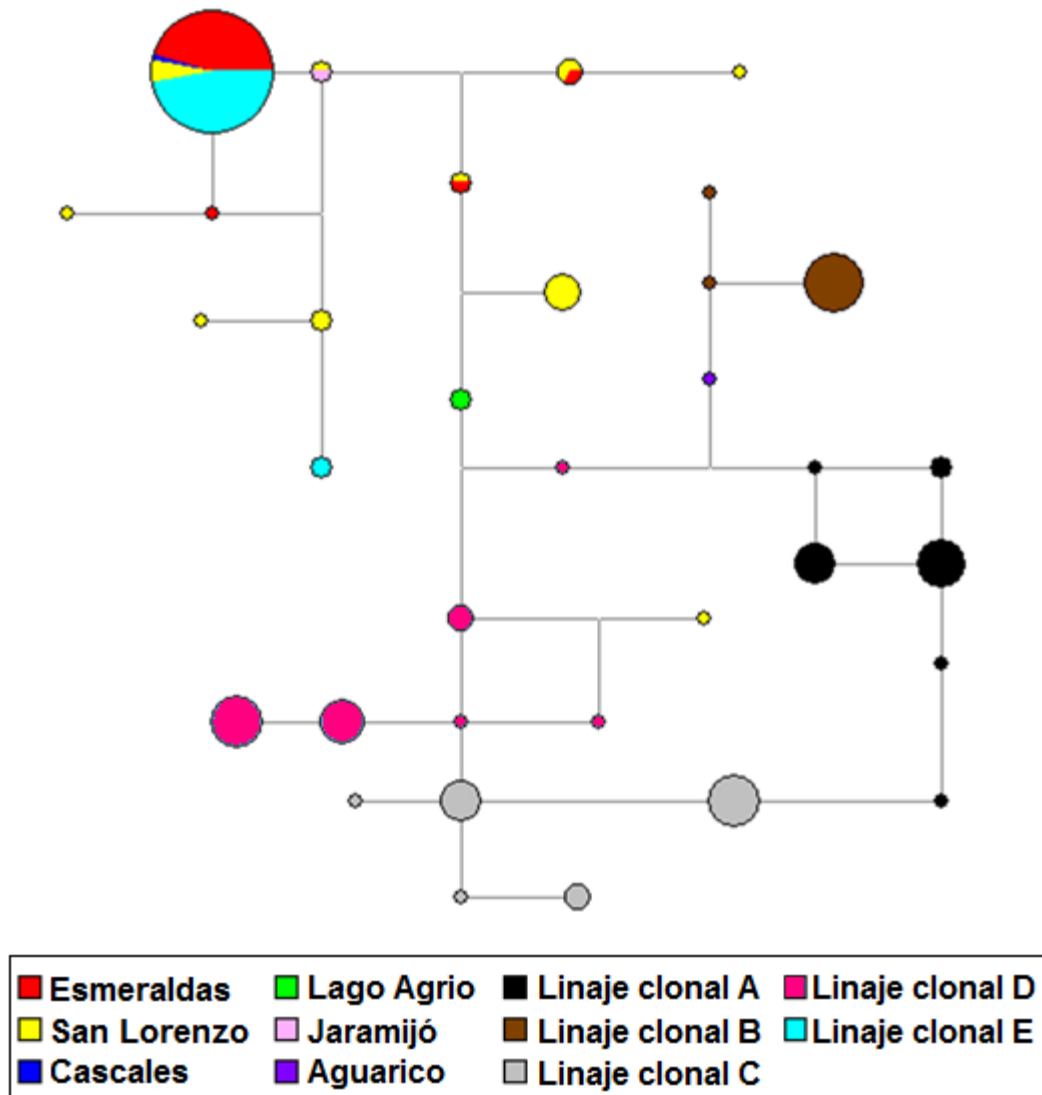
**Figura 12. Árbol del vecino más cercano entre muestras** de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Orellana y Sucumbíos. El análisis se realizó con el programa DARwin ver. 6. El árbol muestra la similitud que existe entre las diferentes muestras. El largo de las ramas indica la diferenciación existente entre muestras. Los colores representan la procedencia de las muestras. Rojo: Esmeraldas, Café: San Lorenzo, Verde: Lago Agrio, Fucsia: Jaramijó, Morado: Aguarico y Azul: Cascales. Los números representan el nombre de la muestra. Se pudo apreciar que un grupo de 36 muestras no presentaron diferenciación entre ellas. La muestra Pf 043 (San Lorenzo) presentó poca diferenciación con las 36 muestras, y las muestras Pf 050 (Aguarico) y el grupo de las muestras Pf 024, Pf 025 (ambas de San Lorenzo) y Pf 031 (Esmeraldas) presentaron gran diferenciación.



**Figura 13.** Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* en Ecuador analizada con el programa Structure ver. 2.3.4. Cada color representa una población diferente (K = 2 -5), cada barra vertical representa un haplotipo específico. El número más probable de poblaciones dado por Structure Harvester fue K = 3.



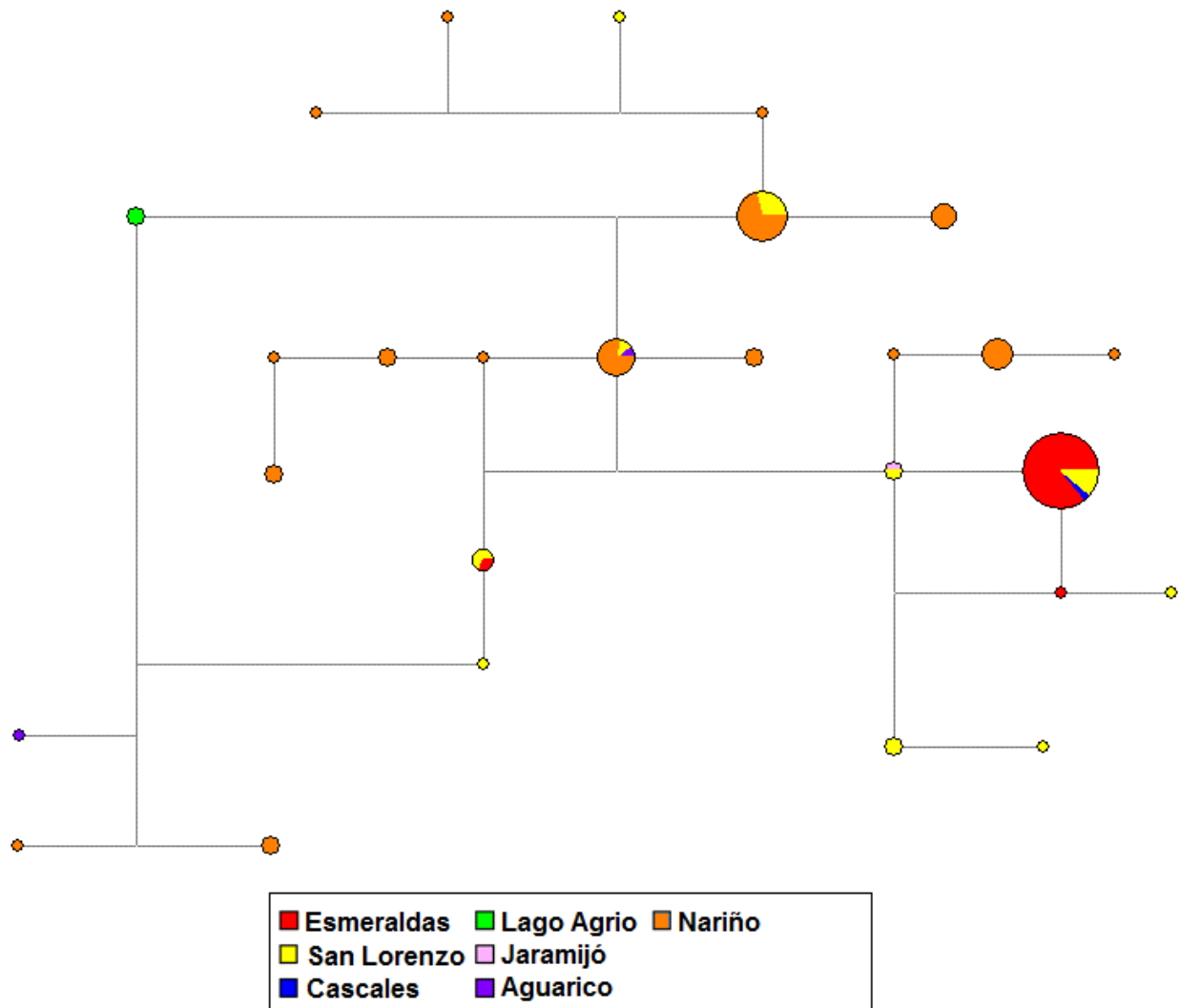
**Figura 14.** Mapa distribución de las muestras de *P. falciparum* en Ecuador y Perú. El tamaño de los círculos representa la cantidad de muestras presentes en cada localidad. Los diferentes colores representan el origen de las muestras; Rojo: Esmeraldas, Amarillo: San Lorenzo, Rosado: Padre Cocha, Verde: Pampa Hermosa, Turquesa: Zarumilla; Azul: Caballococha.



**Figura 15.** Red de relaciones genéticas entre *P. falciparum* ecuatorianos y peruanos. Red realizada con el programa Network 4.6.1.3 que muestra la relación genética entre las muestras ecuatorianas y los linajes clonales (A, B, C, D y E) de Perú. El tamaño de los círculos representa la cantidad de muestras que presentan el mismo haplotipo y los colores representan el lugar de procedencia de las muestras. La mayoría de las muestras de Esmeraldas son idénticas a la mayoría de las muestras del linaje clonal E, mientras que las muestras de San Lorenzo tienen mayor similitud con el linaje clonal D de Perú.



**Figura 16. Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* de Ecuador y los linajes clonales (A, B, C, D y E) de Perú** analizada con el programa Structure ver. 2.3.4. ordenado por Q (número de haplotipos). Cada color representa una subpoblación diferente (Grupo 1 al 5) clasificado por el programa Strucutre. Cada bloque vertical representa una población. El eje Y representa la proporción estimada de miembros que pertenecen a cada uno de los grupos: Grupo 1 (N = 33) contenía muestras del linaje clonal D, tres muestras de San Lorenzo y una muestra de Esmeraldas, Grupo 2 (N = 20) estuvo conformado por dos muestras del linaje clonal E, una muestra de Esmeraldas, las muestras de Lago Agrio y la mayoría de muestras de San Lorenzo, Grupo 3 (N = 69) contenía a las muestras del linaje clonal E, dos muestras de San Lorenzo, la muestra de Cascales y la mayoría de las muestras de Esmeraldas, Grupo 4 (N = 26) se encontraban las muestras del linaje clonal C, Grupo 5 (N = 41) contenía a las muestras del linaje clonal A y B y la muestra de Aguarico.

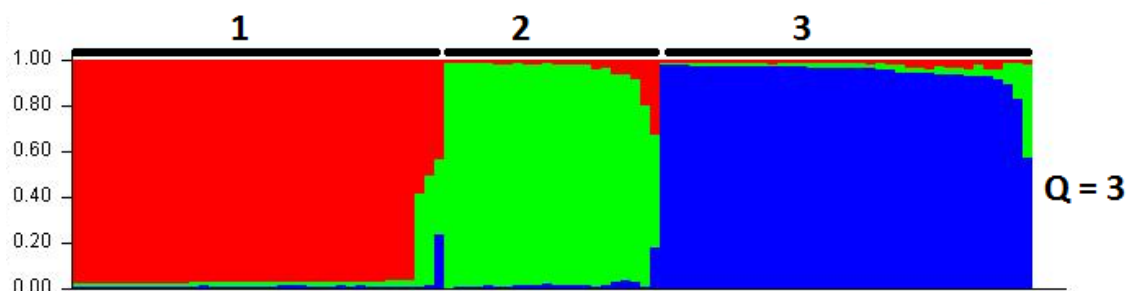


**Figura 17. Red de relaciones genéticas entre *P. falciparum* ecuatorianos y colombianos.**

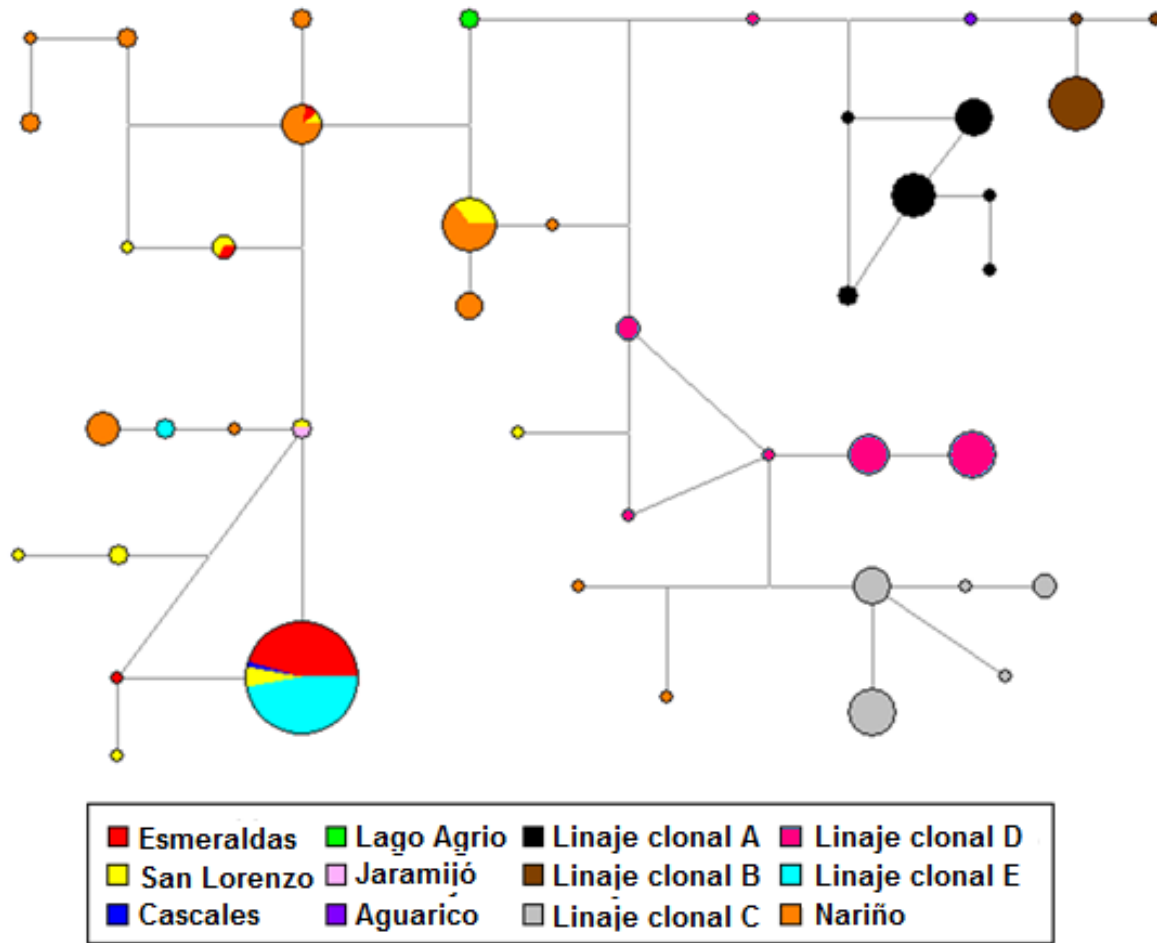
Red realizada con el programa Network 4.6.1.3, muestra la relación genética entre las muestras ecuatorianas y las muestras del departamento de Nariño de Colombia. El tamaño de los círculos representa la cantidad de muestras que presentan el mismo haplotipo y los colores representan el lugar de procedencia de las muestras. Existió mayor similitud entre las muestras de San Lorenzo y Nariño que entre las muestras de Esmeraldas y Nariño. La mayoría de las muestras de Esmeraldas, cuatro muestras de San Lorenzo y la muestra de Cascales tuvieron una configuración genética idéntica. Las muestras Pf 009 (Esmeraldas), Pf 042 (Jaramijó) y Pf



049 (San Lorenzo) presentaron gran similitud con el grupo más grande de muestras de Esmeraldas. Las muestras de Nariño presentaron varios grupos de haplotipos, en algunos de ellos se encontraban muestras de San Lorenzo que presentaron alta similitud genética, e incluso iguales. Las muestras de la Amazonia presentaron mayor similitud con las muestras de San Lorenzo.



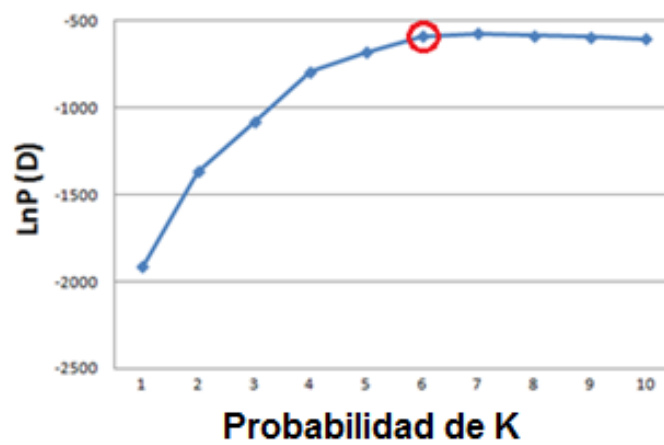
**Figura 18. Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* de Ecuador y Nariño (Colombia)** analizada con el programa Structure ver. 2.3.4. Cada color representa una subpoblación diferente (Grupo 1 al 3) clasificado por el programa Strucutre. Cada bloque vertical representa una población. El eje Y representa la proporción estimada de miembros que pertenecen a cada uno de los grupos: Grupo 1 ( $N = 38$ ) que estuvo conformado por la mayoría de las muestras de Esmeraldas, por cinco muestras de San Lorenzo y la muestra de Cascales. El Grupo 2 ( $N = 22$ ) que contenía a una muestra de Esmeraldas, la muestra de Jaramijó, la muestra de Aguarico, las dos muestras de Lago Agrio, unas pocas muestras de San Lorenzo y unas pocas muestras de Nariño. El grupo 3 ( $N = 38$ ) contenía una muestra de Esmeraldas, siete muestras de San Lorenzo y mayoría de muestras de Nariño.



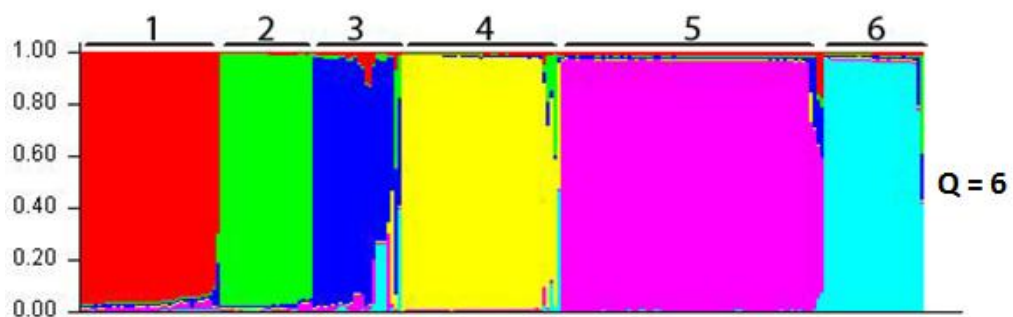
**Figura 19. Red de relaciones genéticas entre *P. falciparum* ecuatorianos, peruanos y colombianos.** Red realizada con el programa Network 4.6.1.3 que muestra la relación genética entre las muestras ecuatorianas y los linajes clonales (A, B, C, D y E) de Perú y poblaciones de Nariño (Colombia). El tamaño de los círculos representa la cantidad de muestras que presentan el mismo haplotipo y los colores representan el lugar de procedencia de las muestras. La mayoría de las muestras de Esmeraldas son idénticas a las muestras del linaje clonal E, las muestras de San Lorenzo tienen mayor similitud con las muestras de Nariño, un par de muestras de la Amazonia tienen mayor similitud a las muestras de Esmeraldas, otro par

de muestras tienen mayor similitud a las muestras de Nariño y una muestra tiene mayor similitud con las muestras peruanas.

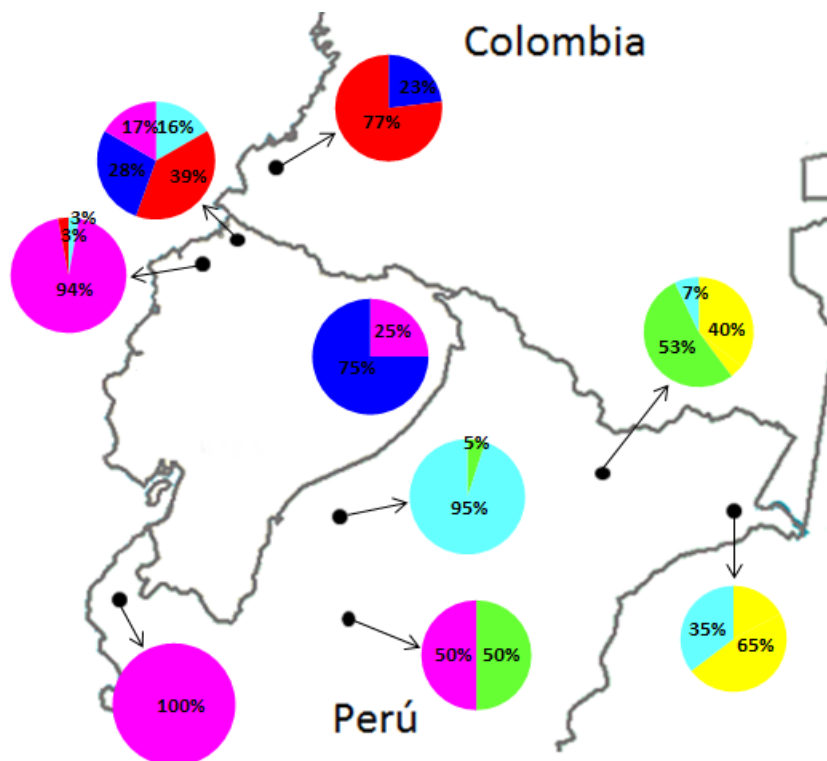
A.



B.



C.



**Figura 20. Estructura de la población de muestras de *P. falciparum* de Ecuador en comparación con Colombia y Perú (N = 238).** **A.** Gráfico de  $\ln P(D)$  vs. Probabilidad de K, muestra el mejor K (K = 6) obtenido de *Structure Harvester*. **B.** Inferencia de la estructura genética de *P. falciparum* de Ecuador y las localidades de Perú (Padre Cocha, Caballococha, Zarumilla, Pampa Hermosa, Ullpayacu) y la localidad colombiana de Nariño, obtenido de Structure ver. 2.3.4. Cada color representa a una población determinada por el programa. Cada población estuvo representada por un bloque vertical. El eje Y representa la proporción estimada de miembros de cada uno de los grupos. El número de individuos asignados a cada uno de los grupos fue: Grupo 1 (N = 32) estuvo conformado por unas pocas muestras de San Lorenzo, un muestra de Esmeraldas y la mayoría de muestras de Nariño, Grupo 2 (N = 24) muestras de Ullpayacu, Pampa Hermosa y Caballococha, Grupo 3 (N = 19) estuvo conformado por las muestras Lago Agrio, pocas muestras de San Lorenzo, la muestra de

Orellana y pocas muestras de Nariño, Grupo 4 ( $N = 57$ ) contenía muestras de Caballococha y Padre Cocha, Grupo 5 ( $N = 80$ ) estaba conformado por casi todas las muestras de Esmeraldas, pocas muestras de San Lorenzo, la muestra de Jaramijó y las muestras de Zarumilla y Pampa Hermosa, Grupo 6 ( $N = 26$ ) estaba conformado por una muestra de Esmeraldas, tres muestras de San Lorenzo y las muestras de Caballococha, Padre Cocha y Ullpayacu. **C. Distribución de los seis grupos en Ecuador, Colombia y Perú.** Grupo 1 - Rojo; Grupo 2 – Verde; Grupo 3 – Azul; Grupo 4 – Amarillo; Grupo 5 – Fucsia; Grupo 6 - Turquesa. La localidad de Esmeraldas presenta, en su mayoría, una población que es la misma que presenta la población peruana Zarumilla, mientras que San Lorenzo presenta mayor diversidad que Esmeraldas, las dos poblaciones presentes en San Lorenzo se encuentran en Nariño lo que sugiere miración entre las localidades.

## 10. TABLAS

**Tabla 1. Lista de primers utilizados en la determinación molecular de la especie *Plasmodium falciparum*.**

Primer	Secuencia (5'-3')
PLU5 (Snounou, 1996)	CCT GTT GCC TTA AAC TTC
PLU6 (Snounou, 1996)	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG
FAL1 (Snounou, 1996)	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT
FAL2 (Snounou, 1996)	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TCA TGA CTA CCC GTC
Genus forward (Lucchi, <i>et al.</i> 2013)	GGC CTA ACA TGG CTA TGA CG
Genus reverse (Lucchi, <i>et al.</i> 2013)	FAM-ag gcg cat agc gcc tgg CTG CCT TCC TTA GAT GTG GTA GCT
Falcip forward (CDC, 2014)	ACC CCT CGC CTG GTG TTT TT
Falcip reverse (CDC, 2014)	FAM-ag gcg gat acc gcc tgg TCG GGC CCC AAA AAT AGG AA



**Tabla 2. Lista de primers utilizados en la determinación molecular de los microsatélites neutrales de la especie *Plasmodium falciparum*.**

Primer	Secuencia (5'-3')
Neu1_TA1_F (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	CTA CAT GCC TAA TGA GCA
Neu1_TA1_R (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	TTT TAT CTT CAT CCC CAC
Neu1_TA1_F_HEX (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	CC GTC ATA AGT GCA GAG C
Neu3_POLYA_F (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	AAA ATA TAG ACG AAC AGA
Neu3_POLYA_R (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	ATC AGA TAA TTG TTG CTA
Neu3_POLYA_R_FAM (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	GA AAT TAT AAC TCT ACC A
Neu7_PFPK2_F (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	CTT TCA TCG ATA CTA CGA
Neu7_PFPK2_R (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	CCT CAG ACT GAA ATC CAT
Neu7_PFPK2_R_HEX (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	AAA GAA GGA ACA AGC AGA
Neu9_TA109_F (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	TAG GGA ACA TCA TAA GGA T
Neu9_TA109_R (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	CCT ATA CCA AAC ATG CTA AA
Neu9_TA109_F_FAM (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	GG TTA AAT CAG GAC AAC AT
Neu12_2490_F (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	TTC TAA ATA GAT CCA AAG
Neu12_2490_R (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	ATG ATG TGC AGA TGA CGA
Neu12_2490_FAM (Anderson, <i>et al.</i> 1999)	AGA ATT ATT GAA TGC AC
313_F_FAM (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	TC CCT TTT AAA ATA GAA GAA A
313_R (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	GAT TAT ATG AAA GGA TAC ATG
383_F_HEX (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	AA TAG GAA CAA ATC ATA TTG
383_R (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	AGA TAT CCA GGT AAT AAA AAG

**Tabla 3. Ubicación, tamaño del producto, motivo de repetición y rango de tamaño de los microsatélites neutrales.**

Microsatélite	Cromosoma	Tamaño del producto en 3D7	Motivo de Repetición	Rango de Tamaño
TA1	6	185 pb	ATT	171
Poly- $\alpha$	4	150 pb	ATT	149-182
PfPK2	12	170 pb	TAA	159-177
TA109	6	173 pb	AAT	159
2490	10	82 pb	TAA	72-84
C2M34	2	259 pb	AT, TATT	224-232
C3M69	3	172 pb	TA	122-140

**Tabla 4. Lista de primers utilizados en la determinación molecular de los genes *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en la especie *Plasmodium falciparum*.**

Primer	Secuencia (5'-3')
2E12F1 (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	GGT TTC CTT CTC AAA AAA TAA AG
2E12R1 (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	TCT ACA TGT GCT TGA GTT TCG
2E12F (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	GTA TTA TCC GCT GCC GTT TTT GCC
2E12R (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	CTA CAC AAG TTA TTA TTA AAT GCG GAA
3E12F1 (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	GGT TTC CTT CTC AAA AAA TAA AA
3E12R1 (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	CCT GCA TGT GCT TGA CTT TA
3E12F (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	ATA TTA TC GCT GCC GTT TTT GCT
3E12R (Abdallah, <i>et al.</i> 2014)	CTA AAC AAG TTA TTG TTA AAT TCG GAG

**Tabla 5. Muestras de *P. falciparum* utilizadas en este estudio.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Fecha de colección</b>
Pf 003	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	01-2013
Pf 004	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	01-2013
Pf 006	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 007	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 008	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 009	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 010	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 011	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	05-2013
Pf 012	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	05-2013
Pf 013	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	05-2013
Pf 014	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 015	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	05-2013
Pf 016	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	06-2013
Pf 017	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	06-2013
Pf 018	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	06-2013
Pf 019	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	06-2013
Pf 020	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	06-2013
Pf 021	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	06-2013
Pf 022	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	06-2013
Pf 023	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	06-2013
Pf 024	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	07-2013
Pf 025	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	07-2013
Pf 026	Esmeraldas	Esmeraldas	Tachina	07-2013
Pf 027	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	07-2013
Pf 028	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	07-2013
Pf 030	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	08-2013
Pf 031	Esmeraldas	Esmeraldas	Simón Plata Torres	09-2013
Pf 032	Esmeraldas	Esmeraldas	Simón Plata Torres	09-2013
Pf 033	Esmeraldas	Esmeraldas	Simón Plata Torres	09-2013

Continuación de la Tabla 5.

<b>Código de la muestra</b>	<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Fecha de colección</b>
Pf 034	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	10-2013
Pf 035	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	10-2013
Pf 036	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	10-2013
Pf 037	Esmeraldas	Esmeraldas	Simón Plata Torres	11-2013
Pf 038	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	11-2013
Pf 039	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	11-2013
Pf 040	Esmeraldas	Esmeraldas	5 de Agosto	11-2013
Pf 041	Esmeraldas	Esmeraldas	Vuelta Larga	11-2013
Pf 042	Manabí	Jaramijó	Jaramijó	01-2014
Pf 043	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	01-2014
Pf 044	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	01-2014
Pf 045	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	01-2014
Pf 046	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	01-2014
Pf 047	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	01-2014
Pf 048	Esmeraldas	San Lorenzo	Calderón	01-2014
Pf 049	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	02-2014
Pf 050	Orellana	Aguarico	Nuevo Rocafuerte	02-2014
Pf 051	Esmeraldas	San Lorenzo	Ancón	03-2014
Pf 052	Esmeraldas	San Lorenzo	Ancón	05-2014
Pf 053	Esmeraldas	Esmeraldas	Esmeraldas	05-2014
Pf 055	Sucumbíos	Cascales	No se reportó	06-2014
Pf 056	Esmeraldas	San Lorenzo	Alto Tambo	07-2014
Pf 057	Esmeraldas	San Lorenzo	Urbina	08-2014
Pf 058	Esmeraldas	San Lorenzo	Tululbi	08-2014
Pf 059	Esmeraldas	San Lorenzo	No se reportó	08-2014
Pf 060	Esmeraldas	San Lorenzo	No se reportó	08-2014
Pf 061	Sucumbíos	Lago Agrio	El Eno	09-2014
Pf 062	Sucumbíos	Lago Agrio	El Eno	09-2014
Pf 063	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	10-2014
Pf 064	Esmeraldas	San Lorenzo	San Lorenzo	12-2014

**Tabla 6. Muestras de *P. falciparum* analizadas por PCR-PET.** Las muestras con CT mayores a 40.5 son consideradas como negativas. CP, Control Positivo. CN, Control Negativo.

Muestra	CT	CT Promedio	CT d.s
Pf041	30,62998	30,53016	0,14116
Pf041	30,43035	30,53016	0,14116
Pf042	37,26308	36,82584	0,61835
Pf042	36,38860	36,82584	0,61835
Pf043	30,98108	30,63340	0,49169
Pf043	30,28572	30,63340	0,49169
Pf044	33,26589	33,21365	0,07388
Pf044	33,16141	33,21365	0,07388
Pf045	35,48093	35,12922	0,49738
Pf045	34,77752	35,12922	0,49738
Pf046	26,75034	26,67143	0,11159
Pf046	26,59253	26,67143	0,11159
Pf047	27,75734	27,90087	0,20298
Pf047	28,04440	27,90087	0,20298
Pf048	25,96817	25,80554	0,23000
Pf048	25,64291	25,80554	0,23000
Pf049	28,73896	28,97841	0,33863
Pf049	29,21786	28,97841	0,33863
Pf050	30,93469	31,00644	0,10147
Pf050	31,07819	31,00644	0,10147
Pf051	30,49141	30,44168	0,07033
Pf051	30,39195	30,44168	0,07033
Pf052	30,33669	30,10300	0,33048
Pf052	29,86931	30,10300	0,33048
Pf053	30,25514	29,49845	1,07012
Pf053	28,74176	29,49845	1,07012
Pf054	41,89349	40,90670	1,39553
Pf054	39,91991	40,90670	1,39553
Pf055	32,58340	32,49206	0,12918
Pf055	32,40072	32,49206	0,12918
Pf056	33,46960	33,29493	0,24702
Pf056	33,12026	33,29493	0,24702

Continuación de la Tabla 6.

<b>Muestra</b>	<b>C<sub>T</sub></b>	<b>C<sub>T</sub></b>	<b>C<sub>T</sub> d.s</b>
	<b>Promedio</b>		
Pf057	29,20014	29,26694	0,09447
Pf057	29,33374	29,26694	0,09447
Pf058	32,42888	32,05375	0,53052
Pf058	31,67862	32,05375	0,53052
Pf059	33,88294	33,52893	0,50065
Pf059	33,17492	33,52893	0,50065
Pf060	32,15754	32,24671	0,12611
Pf060	32,33588	32,24671	0,12611
Pf061	26,10407	26,05443	0,07019
Pf061	26,00480	26,05443	0,07019
Pf062	31,32032	31,19212	0,18130
Pf062	31,06392	31,19212	0,18130
Pf063	28,80449	28,86273	0,08236
Pf063	28,92097	28,86273	0,08236
Pf064	27,75978	27,77451	0,02083
Pf064	27,78923	27,77451	0,02083
CP	21,82963	22,09974	0,38199
CP	22,36984	22,09974	0,38199
CN	No determinado		
CN	No determinado		

**Tabla 7. Presencia de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* en las muestras colectadas.** Cada una de las muestras fue analizada para determinar la presencia del gen *Pfhrp2* y el gen *Pfhrp3*, además se comprobó la presencia del parásito mediante frotis sanguíneo y prueba rápida. **Pf.** *P. falciparum*. **Pan.** *Plasmodium* spp. **ND.** No hay datos

Muestras	HRP2	HRP3	Frotis	Prueba rápida
Pf 003	+	+	Sí	ND
Pf 004	+	+	Sí	ND
Pf 006	+	+	Sí	ND
Pf 007	+	+	Sí	ND
Pf 008	+	+	Sí	ND
Pf 009	+	+	Sí	ND
Pf 010	+	+	Sí	ND
Pf 011	+	+	Sí	ND
Pf 012	+	+	Sí	ND
Pf 013	+	+	Sí	ND
Pf 014	+	+	Sí	ND
Pf 015	+	+	Sí	ND
Pf 016	-	+	Sí	ND
Pf 017	+	+	Sí	ND
Pf 018	+	+	Sí	ND
Pf 019	+	+	Sí	ND
Pf 020	+	+	Sí	ND
Pf 021	+	+	Sí	ND
Pf 022	+	+	No	ND
Pf 023	+	+	Sí	ND
Pf 024	+	+	Sí	ND
Pf 025	+	+	Sí	ND
Pf 026	+	+	Sí	ND
Pf 027	+	+	Sí	ND
Pf 028	+	+	Sí	ND
Pf 030	-	-	Sí	ND
Pf 031	-(CDC)	-	Sí	ND
Pf 032	+	+	Sí	ND
Pf 033	+	-	Sí	ND
Pf 034	+	+	Sí	ND
Pf 035	+	+	Sí	ND
Pf 036	+	+	No	ND

Continuación de la Tabla 7.

<b>Muestras</b>	<b>HRP2</b>	<b>HRP3</b>	<b>Frotis</b>	<b>Prueba rápida</b>
Pf 037	+	+	Sí	ND
Pf 038	+	-	Sí	Pf
Pf 039	+(CDC)	-	Sí	ND
Pf 040	+(CDC)	-	Sí	Pf
Pf 041	+	-	Sí	Pan, Pf
Pf 042	+	-	No	ND
Pf 043	+	+	Sí	Pan, Pf
Pf 044	+	+	Sí	Pf
Pf 045	+	-	Sí	Pf
Pf 046	+	-	Sí	Pan, Pf
Pf 047	+	-	Sí	Pf
Pf 048	+	-	Sí	Pan, Pf
Pf 049	+	+	Sí	Pan, Pf
Pf 050	-	-	Sí	Pan
Pf 051	+	+	Sí	Pan, Pf
Pf 052	+	+	Sí	Pan, Pf
Pf 053	+	-	Sí	Pf
Pf 055	-	-	Sí	Pf
Pf 056	+	-	Sí	Pf
Pf 057	-	-	Sí	Pan, Pf
Pf 058	+	-	Sí	Pf
Pf 059	-	-	Sí	Pf
Pf 060	+	-	Sí	Pan, Pf
Pf 061	+	+	Sí	Pan, Pf
Pf 062	+	-	Sí	Pf
Pf 063	+	+	Sí	Pan, Pf
Pf 064	+	-	Sí	Pan, Pf



**Tabla 8. Prevalencia de *Pfhrp2* y prevalencia *Pfhrp3* por cada localidad.**

<b>Localidad</b>	<b>Prevalencia de <i>Pfhrp2</i> (%)</b>	<b>Prevalencia de <i>Pfhrp3</i> (%)</b>
Aguarico	0 (0)	0 (0)
Cascales	0 (0)	0 (0)
Esmeraldas	31 (94)	26 (79)
Jaramijó	1 (100)	0 (0)
Lago Agrio	2 (100)	1 (50)
San Lorenzo	17 (85)	9 (45)

**Tabla 9. Prevalencia de *Pfhrp2* y *Pfhrp3* por cada localidad.**

<b>Localidad</b>	<b>Presencia de <i>Pfhrp2</i> (%)</b>	<b>Presencia de <i>Pfhrp3</i> (%)</b>	<b>Presencia de <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> (%)</b>	<b>Ausencia de <i>Pfhrp2</i> y <i>Pfhrp3</i> (%)</b>
Aguarico	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Cascales	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Esmeraldas	6 (18)	1 (3)	26 (76)	1 (3)
Jaramijó	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Lago Agrio	1 (50)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
San Lorenzo	8 (40)	0 (0)	9 (45)	3 (15)

**Tabla 10. Número de alelos en la población obtenido con el programa Arlequin en Esmeraldas.**

<b>Locus</b>	<b>Número de muestras amplificadas</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>Heterocigosidad esperada</b>
TA1	34	1	0,000
Poly-α	34	2	0,061
PfPK2	34	1	0,000
TA109	34	1	0,000
2490	34	2	0,061
C2M34	34	2	0,061
C3M69	34	2	0,061
<b>Media</b>	34,000	1,571	0,035
<b>d.s</b>	0,000	0,000	0,032

**Tabla 11. Número de alelos en la población obtenido con el programa Arlequin en San Lorenzo.**

<b>Locus</b>	<b>Número de muestras amplificadas</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>Heterocigosidad esperada</b>
TA1	20	1	0,000
Poly-α	20	4	0,696
PfPK2	20	4	0,684
TA109	20	1	0,000
2490	20	2	0,351
C2M34	19	4	0,477
C3M69	20	2	0,281
<b>Media</b>	19,857	2,571	0,356
<b>d.s</b>	0,447	1,095	0,288

**Tabla 12. Heterocigosidad esperada en las poblaciones ecuatorianas, linajes peruanos y Nariño (Colombia).**

<b>Locus</b>	<b>Esmeraldas</b>	<b>San Lorenzo</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>Nariño</b>	<b>Media</b>	<b>d.s.</b>	<b>He total</b>
TA1	0,000	0,000	0,301	0,111	0,520	0,516	0,000	0,000	0,207	0,238	0,425
Poly-a	0,061	0,696	0,000	0,000	0,000	0,378	0,000	0,391	0,162	0,273	0,742
PfPK2	0,000	0,684	0,159	0,000	0,000	0,373	0,114	0,656	0,190	0,256	0,667
TA109	0,000	0,000	0,000	0,209	0,000	0,000	0,000	0,267	0,029	0,079	0,345
2490	0,061	0,351	0,159	0,000	0,271	0,071	0,114	0,101	0,147	0,124	0,652
C2M34	0,061	0,477	0,000	0,000	0,077	0,000	0,000	0,238	0,088	0,175	0,649
C3M69	0,061	0,281	0,489	0,000	0,280	0,000	0,114	0,391	0,175	0,182	0,733
<b>Media</b>	0,035	0,356	0,158	0,046	0,164	0,191	0,049	0,292	0,143	0,114	0,602
<b>d.s</b>	0,032	0,288	0,185	0,083	0,199	0,223	0,061	0,215	0,153	0,095	0,155

**Tabla 13. Heterocigosidad esperada y desequilibrio de ligamiento en *P. falciparum* Ecuatorianos, obtenido con el programa Lian.**

Localidad	Número de muestras	Índice de Asociación ( $I_A^S$ )
Esmeraldas	34	0,4297
San Lorenzo	20	0,0884

**Tabla 14. Comparación de Fsts en muestra de *P. falciparum* de Ecuador, Perú y Colombia. Linajes clonales de Perú (A, B, C, D, E).**

	Esmeraldas	San Lorenzo	A	B	C	D	E	Nariño
<b>Esmeraldas</b>	0,00000							
<b>San Lorenzo</b>	0,49159	0,00000						
<b>A</b>	0,65728	0,22247	0,00000					
<b>B</b>	0,88305	0,45465	0,52385	0,00000				
<b>C</b>	0,66282	0,23997	0,32011	0,53514	0,00000			
<b>D</b>	0,64222	0,22716	0,30701	0,51671	0,32227	0,00000		
<b>E</b>	-0,00028	0,45835	0,62915	0,84912	0,63571	0,61619	0,00000	
<b>Nariño</b>	0,51839	0,04018	0,21411	0,40369	0,22942	0,21832	0,49658	0,00000

**Tabla 15. AMOVA de las muestras Ecuatorinas, Peruanas y Colombianas.**

<b>División</b>	<b>Fuente de variación</b>	<b>Porcentaje de Variación</b>	<b>Índices de fijación</b>
Un grupo , dos localidades: Esmeraldas, San Lorenzo	Entre poblaciones	1,05	<b>FST:</b> 0,42143 <sup>**</sup>
	Dentro de las poblaciones	57,86	<b>FCT:</b> 0,01047 <sup>NS</sup>
Dos grupos (países), dos localidades y cinco linajes clonales: Esmeraldas, San Lorenzo, Linajes clonales A, B, C, D, E	Entre poblaciones	0	<b>FST:</b> 0,50277 <sup>NS</sup>
	Entre grupos	56,06	<b>FSC:</b> 0,52997 <sup>**</sup>
	Dentro de las poblaciones	49,72	<b>FCT:</b> -0,05860 <sup>NS</sup>
Dos grupo (países), seis localidades: Esmeraldas, San Lorenzo, CC, PC, PP, WA	Entre poblaciones	0	<b>FST:</b> 0,42225 <sup>NS</sup>
	Entre grupos	46,45	<b>FSC:</b> 0,44569 <sup>**</sup>
	Dentro de las poblaciones	57,78	<b>FCT:</b> -0,04229 <sup>NS</sup>
Dos grupo (países), cuatro dos localidades y dos linajes clonales: Esmeraldas, San Lorenzo, Linajes clonales D, E	Entre poblaciones	0	<b>FST:</b> 0,44085 <sup>NS</sup>
	Entre grupos	74,69	<b>FSC:</b> 0,57187 <sup>**</sup>
	Dentro de las poblaciones	55,91	<b>FCT:</b> -0,30601 <sup>NS</sup>
Dos grupo (países), tres localidades: Esmeraldas, San Lorenzo, Nariño (Colombia)	Entre poblaciones	2,82	<b>FST:</b> 0,38322 <sup>**</sup>
	Entre grupos	35,50	<b>FSC:</b> 0,36530 <sup>**</sup>
	Dentro de las poblaciones	25,19	<b>FCT:</b> 0,02823 <sup>NS</sup>
Tres grupo (países), tres localidades y cinco linajes clonales: Esmeraldas, San Lorenzo, Linajes clonales A, B, C, D, E, Nariño (Colombia)	Entre poblaciones	0	<b>FST:</b> 0,44915 <sup>NS</sup>
	Entre grupos	45,93	<b>FSC:</b> 0,45468 <sup>**</sup>
	Dentro de las poblaciones	55,08	<b>FCT:</b> -0,01014 <sup>NS</sup>

**Tabla 16. Heterocigosidad esperada en las ecuatorianas, poblaciones peruanas y Nariño (Colombia). CC. Caballococha. PC. Padre Cocha. PP. Zarumilla. WA. Amazonia del Oeste.**

Locus	Esmeraldas	San Lorenzo	CC	PC	PP	WA	Nariño	Media	d.s.	He total
TA1	0,000	0,000	0,286	0,677	0,000	0,248	0,000	0,207	0,238	0,425
Poly-α	0,061	0,696	0,513	0,517	0,000	0,248	0,391	0,162	0,273	0,742
PfPK2	0,000	0,684	0,702	0,513	0,121	0,000	0,656	0,190	0,256	0,667
TA109	0,000	0,000	0,475	0,472	0,000	0,000	0,267	0,029	0,079	0,345
2490	0,061	0,351	0,457	0,568	0,121	0,2478	0,101	0,147	0,124	0,652
C2M34	0,061	0,477	0,646	0,578	0,000	0,248	0,238	0,088	0,175	0,649
C3M69	0,061	0,281	0,646	0,531	0,121	0,248	0,391	0,175	0,182	0,733
<b>Media</b>	0,035	0,356	0,532	0,551	0,052	0,177	0,292	0,143	0,114	0,602
<b>d.s</b>	0,032	0,288	0,144	0,066	0,065	0,121	0,215	0,153	0,095	0,155

**Tabla 17. Comparación de Fsts en muestra de *P. falciparum* de Ecuador, Perú y Colombia. CC. Caballococha. PC. Padre Cocha. PP. Zarumilla. WA. Amazonia del Oeste.**

	Esmeraldas	San Lorenzo	CC	PC	PP	WA	Nariño
<b>Esmeraldas</b>	0,00000						
<b>San Lorenzo</b>	0,49159	0,00000					
<b>CC</b>	0,59213	0,20453	0,00000				
<b>CP</b>	0,49982	0,13531	0,17892	0,00000			
<b>PP</b>	0,00167	0,44596	0,56033	0,47141	0,00000		
<b>WA</b>	0,85969	0,40842	0,45498	0,37383	0,81207	0,00000	
<b>Nariño</b>	0,51839	0,04018	0,19859	0,13548	0,48751	0,38135	0,00000

**Tabla 18. Número de alelos por cada localidad obtenido con el programa Arlequin.** Localidades ecuatorianas, peruanas y Nariño (Colombia).

Locus	Esmeraldas	San Lorenzo	CC	PC	PP	WA	Nariño	Media	d.s	Número total
TA1	1	1	2	3	1	2	1	1,63	0,74	3
Poly-α	2	4	4	3	1	2	3	2,13	1,36	8
PfPK2	1	4	5	4	2	1	3	2,25	1,28	8
TA109	1	1	2	2	1	1	2	1,25	0,46	3
2490	2	2	2	3	2	2	3	2,00	0,54	4
C2M34	2	4	3	4	1	2	3	1,88	1,13	8
C3M69	2	2	3	5	2	2	3	2,00	0,76	8
<b>Media</b>	1,57	2,57	3,00	3,43	1,43	1,71	2,57	1,88	0,49	6,00
<b>d.s</b>	0,54	1,39	1,16	0,98	0,54	0,49	0,79	0,83	0,36	2,52

**Tabla 19. Número de loci polimórficos por cada localidad.** Localidades ecuatorianas, peruanas y Nariño (Colombia).

Estadísticos	Esmeraldas	San Lorenzo	CC	PC	PP	WA	Nariño	Media	d.s
No. copias de genes	34	20	36	47	32	15	39	27,39	7,39
No. Loci	7	7	7	7	7	7	7	7,00	0,00
No. Loci polimórficos	4	4	7	7	3	5	6	3,88	1,13

**Tabla 20. Número de alelos por cada localidad obtenido con el programa Arlequin. a.** Localidades ecuatorianas, linajes clonales de Perú y Nariño (Colombia).

Locus	Esmeraldas	San Lorenzo	A	B	C	D	E	Nariño	Media	d.s	Número total
TA1	1	1	3	2	2	2	1	1	1,63	0,74	3
Poly-α	2	4	1	1	1	4	1	3	2,13	1,36	8
PfPK2	1	4	2	1	1	4	2	3	2,25	1,28	8
TA109	1	1	1	2	1	1	1	2	1,25	0,46	3
2490	2	2	2	1	2	2	2	3	2,00	0,54	4
C2M34	2	4	1	1	2	1	1	3	1,88	1,13	8
C3M69	2	2	2	1	3	1	2	3	2,00	0,76	8
<b>Media</b>	1,57	2,57	1,71	1,29	1,71	2,14	1,43	2,57	1,88	0,49	6,00
<b>d.s</b>	0,54	1,39	0,76	0,49	0,76	1,35	0,54	0,79	0,83	0,36	2,52

**Tabla 21. Número de loci polimórficos por cada localidad.** Localidades ecuatorianas, clones peruanas y Nariño (Colombia).

Estadísticos	Esmeraldas	San Lorenzo	A	B	C	D	E	Nariño	Media	d.s
No. copias de genes	34	20	24	18	26	28	34	39	27,39	7,39
No. Loci	7	7	7	7	7	7	7	7	7,00	0,00
No. Loci polimórficos	4	4	4	2	4	4	3	6	3,88	1,13



## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento informado que se usó para la toma de muestras de las personas que participaron en el estudio.



#### Formulario de Consentimiento Informado.

#### Parte 1. CLÍNICA. Información para el paciente sano y el paciente con enfermedad activa

**Responsables:** Dr. Fabián Sáenz y Dr. Enrique Castro Saavedra

**Organización:** Ministerio de Salud Pública del Ecuador – SNEM y Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Investigación sobre la malaria en Ecuador

**Introducción:** El Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) se encuentra realizando trabajos de investigación sobre la malaria en el Ecuador y deseamos invitarle a participar en esta investigación. Antes de decidir participar o no, usted puede consultar con alguien más sobre su participación. Vamos a leer este documento que tiene los detalles sobre la investigación, sin embargo, si hay alguna palabra que no entienda, por favor, infórmenos para poder explicarle. Usted puede realizar preguntas en cualquier momento.

**Propósito del proyecto:** La Malaria es una enfermedad que afecta a mucha gente en Ecuador. Este proyecto de investigación quiere saber si hay esta enfermedad en su comunidad y porqué. Pedimos su ayuda voluntaria. Su participación ayudará a obtener información valiosa que ayudará a diseñar maneras de controlar y prevenir esta enfermedad.

**Tipo de Intervención:** Esta investigación incluirá responder una encuesta con información general sobre conocimientos de la enfermedad y la toma de sangre del dedo o de la vena.

**Selección de participantes:** Esta es una investigación que se realizará en toda la comunidad, por lo tanto no se necesita requisitos especiales para su participación.

**Participación voluntaria:** Usted puede elegir libremente participar o no participar en absoluto en este proyecto de investigación. Si usted no desea participar o se retira del estudio no habrá ninguna consecuencia y no perderá ninguno de los beneficios de atención de salud que existen normalmente. Para que usted pueda participar en este proyecto, es necesario que usted entienda lo que se vamos a necesitar. Si acepta colaborar voluntariamente con nosotros, debe firmar (o poner su huella digital) en la línea disponible abajo en este formulario.

Usted puede dejar de participar en este proyecto en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. De igual manera, los investigadores pueden terminar su participación en el mismo. Si éste es el caso, usted será notificado. No hay costo por participar en esta investigación. Si usted tiene dudas sobre la investigación o sobre sus derechos en este proyecto de investigación, por favor pregunte al entrevistador o contacte a las personas nombradas abajo.

**Procedimientos:** Un encuestador le pedirá que responda ciertas preguntas sobre su conocimiento de malaria. Además, personal entrenado tomará muestras de sangre. Las muestras de sangre se tomarán una o dos veces mediante un pinchazo en el dedo, con una lanceta, para obtener 10 gotas de sangre. Es posible que se solicite una muestra más grande de sangre para llevar a cabo estudios más detallados, esta vez la sangre será tomada del brazo usando una jeringa para obtener entre 3 y 10 ml de sangre (entre 1 y 3 cucharaditas). Estas muestras serán examinadas por los médicos, de encontrarse que usted requiere tratamiento médico, será referido a las unidades del Ministerio de Salud.

**Investigación:** La investigación utilizará parte de la información clínica y parte de las muestras de sangre sin que estos tengan referencia a su nombre. A sus muestras e información privada se le asignará un código. Esta información será utilizada para estudiar las enfermedades en su comunidad y respuesta a medicamentos y cómo éstas se relacionan con los factores de riesgo a los cuales usted puede estar expuesto. Usted no será identificado por nombre en ningún informe publicado ni en presentaciones de los resultados. Las muestras, sin conexión con su nombre serán almacenadas en refrigeración o congelación y podrán ser utilizadas en el futuro para otros estudios como el cultivo de parásitos obtenidos de su sangre para determinar si hay resistencia a medicamentos, así como estudios de la biología de parásito, previa aprobación por parte de un comité de ética.

**Confidencialidad:** Toda la información que usted proporcione será mantenida confidencialmente y utilizada solamente para propósitos de la investigación sin conexión a su nombre. Los resultados generales, serán compartidos con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y su comunidad.

**Riesgos:** Los riesgos potenciales asociados a su participación son las molestias al sacar la sangre. La toma de muestras de sangre será realizada por profesionales debidamente entrenados, utilizando agujas y lancetas nuevas, siguiendo normas internacionales, lo que reducirá la posibilidad de molestias por la toma de sangre.

**Beneficios:** Los beneficios potenciales de su participación incluyen un incremento en el conocimiento sobre la prevención de enfermedades tropicales y la futura implementación de estrategias de control e intervención, que tienen el potencial de mejorar la salud de su comunidad.

**Compensaciones:** No existe compensación financiera por su participación en el estudio.

**Declaración general de consentimiento:** “Al firmar (o poner mi huella digital) abajo, declaro que los investigadores a cargo de este proyecto me han explicado los propósitos y los beneficios y riesgos de la investigación, y que los he entendido plenamente. Entiendo claramente que no hay compensación monetaria por mi participación de parte de la PUCE, ni de las otras instituciones implicadas, y/o de sus empleados, y que en caso de alguna lesión que pudiese sufrir por mi participación en esta investigación, se buscarán las prestaciones médicas necesarias sin costo para mí a través de las unidades del Ministerio de Salud”. Al firmar (o poner mi huella digital) abajo declaro que entiendo el alcance y los objetivos del Proyecto, y estoy dispuesto a participar voluntariamente”.

Nombre del participante:

Firma (o huella digital) del participante o su representante legal. \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo:

Firma del testigo (en caso de analfabetismo) \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

**Declaración de asentimiento** (para menores entre 12 y 18 años de edad)

Yo, \_\_\_\_\_, tengo \_\_\_\_\_ años de edad, entiendo los objetivos de esta investigación y que es lo que se espera de mí. Por lo tanto acepto participar voluntariamente.

Firma, del menor) \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

Nombre del investigador/asistente:

Firma del investigador/asistente: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 201\_\_

Ha sido proporcionado, al participante, una copia de este documento \_\_\_\_\_ (iniciales del investigador/asistente)

**Personas a contactar:** Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité de Ética de la PUCE, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted tiene preguntas sobre esta investigación por favor comuníquese con el Dr. Fabián Sáenz o con la Dra. Sofía Ocaña, CIEI Universidad Católica del Ecuador. Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1700 ext. 2272 ó 2271. Fax. (02) 299 1689 Email: [fsaenz213@puce.edu.ec](mailto:fsaenz213@puce.edu.ec) o [sbocana@puce.edu.ec](mailto:sbocana@puce.edu.ec).

Si tiene preguntas sobre sus derechos como participante en esta investigación comuníquese con el Dr. Arturo Donoso, Comité de Ética, Universidad Católica del Ecuador Ave. 12 de Octubre 1076 y Roca. Tel. (02) 299 1533 ext. . Fax. 02 299 1656 Email: [ajdonoso@puce.edu.ec](mailto:ajdonoso@puce.edu.ec).



Calle 10ma. Y Av. 6ta. frente a Cdla. Naval Norte  
Teléfonos: 593 (4) 392217 – 397551 – 284130 ext.: 125  
[snem@msp.gob.ec](mailto:snem@msp.gob.ec)

**Anexo 2. Material necesario para realizar electroforesis**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
TBE 1X	100 ml
Agarosa	3 gr
SYBR safe	3 $\mu$ l
Blue/Orange 6X	5 $\mu$ l

**Anexo 3. Contenido del TBE 10X en 1 Litro**

<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad</b>
Tris Base, grado molecular	108 gr
Ácido Bórico, grado molecular	55 gr
EDTA, sal disódica, grado molecular	9.3 gr

PARA GRADOS ACADEMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Claudia Abigail Vera Arias, C.I 1802609238 autor del trabajo de graduación “Caracterización poblacional de *Plasmodium falciparum* en Ecuador”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Ecuación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 26 de noviembre de 2015

Srta. Claudia Abigail Vera Arias

C.I 1802609238